T H E S E

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Edwige TYSZKIEWICZ

ETUDES DES MECANISMES DE COUPLAGE ENTRE TRANSFERT DE CHARGE ET ACTIVATION DE L'ION ORTHOPHOSPHATE AU SEIN D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES

Soutenue le 28 juin 1972, devant la Commission d'Examen

Mme	CHAIX	Président
MM.	FREYMANN	
	BUVET	Examinateurs
	COURSAGET	

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Edwige TYSZKIEWICZ

ETUDES DES MECANISMES DE COUPLAGE ENTRE TRANSFERT DE CHARGE ET ACTIVATION DE L'ION ORTHOPHOSPHATE AU SEIN D'UNE SUSPENSION DE CHLOROPLASTES

Soutenue le 28 juin 1972, devant la Commission d'Examen

Mme	CHAIX	Président
MM.	FREYMANN	
	BUVET	Examinateurs
	COURSAGET	

UNIV.
LEIDEN.
BIBL.

I - INTRODUCTION

Tout être vivant pour subsister et se développer dans le milieu où il a à évoluer doit être en mesure à la fois d'y prélever les substances qui permettent l'édification et le fonctionnement de son propre organisme et aussi d'y excréter les produits inutiles ou toxiques résultant de cette activité assimilatrice.

Les aliments nécessaires aux végétaux chlorophylliens sont,du point de vue chimique, très simples : ce sont en effet essentiellement des sels minéraux qui sont puisés dans le sol par les racines, de l'eau qui est absorbée à la fois par les racines et les feuilles et enfin deux gaz : l'oxygène et le gaz carbonique.

Ces échanges gazeux entre le végétal supérieur et l'atmosphère se font essentiellement par les feuilles et d'un point de vue global on constate qu'à l'obscurité de l'oxygène est absorbé et du gaz carbonique dégagé tandis qu'à la lumière c'est l'inverse qui a lieu.

C'est ainsi que tous les atomes de carbone présents dans l'ensemble des molécules organiques d'une cellule chlorophyllienne, proviennent essentiellement du gaz carbonique qui a été absorbé à la lumière par cette cellule.

Il est cependant bien évident que la synthèse d'une molécule donnée au sein d'une cellule chlorophyllienne n'implique pas nécessairement dans chacune de ses étapes l'intervention de la lumière et on donne le nom de PHOTOSYNTHESE aux seules suites de réactions chimiques et photochimiques qui sont à la base de cette autotrophie, c'est à dire qui d'une part interviennent dans le dégagement d'oxygène et qui, d'autre part, conditionnent la synthèse des premiers produits dans lesquels s'intégre le carbone du CO_2 après son passage de l'atmosphère extérieure dans la cellule.

Afin de situer avec précision les recherches qui font l'objet de ce travail dans le cadre général de la photosynthèse, nous allons résumer très brièvement les évènements qui se déroulent dans le chloroplaste au cours de la première milliseconde qui suit l'absorption d'un photon par une molécule de chlorophylle.

Mais tout d'abord qu'est ce que le chloroplaste ?

Il y a déjà plus de cent ans que les cytologistes ont montré qu'au sein de la cellule chlorophyllienne les pigments chlorophylliens et caroténoides, c'est à dire les récepteurs de l'énergie lumineuse, n'étaient pas en solution homogène dans le suc cellulaire mais bien au contraire localisés à l'intérieur de petits corpuscules : les chloroplastes.

Comme le montre la figure 4 (pg. 27) ces chloroplastes sont ovoïdes, leur dimension variant entre 2 et 10 microns. La microscopie optique à fort grossissement et à fortiori la microscopie électronique permettent d'y distinguer, au sein d'un stroma relativement homogène et non structuré, des grana en nombre variable qui sont constitués par des lipides, des protéines et la totalité des pigments (chlorophylle et carotène), l'ensemble étant réparti suivant une structure lamellaire. L'empilement de 3 à 15 semblables lamelles constituant le granum.

C'est au sein de ces grana que se déroule l'acte photochimique primaire, c'est à dire l'ensemble des processus physiques et chimiques qui sont la conséquence directe et immédiate de l'absorption du photon par les molécules de pigments.

Le tableau, présenté sous le titre "Echelle des temps" pg. 3 , résume les évènements successifs se déroulant dans le chloroplaste à la suite de l'absorption du photon par les pigments du chloroplaste.

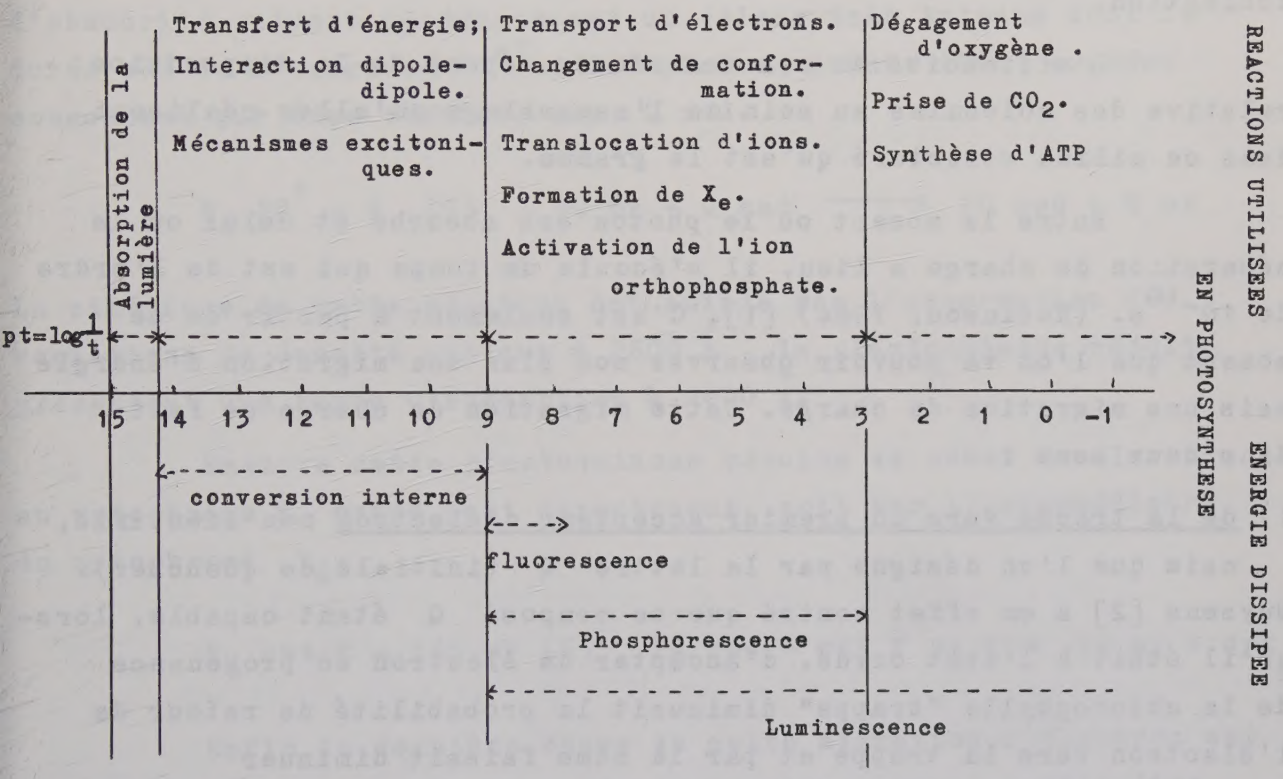
La période des ondes lumineuses visibles efficaces dans la photosynthèse étant 10^{-15} s, cette durée fournit un ordre de grandeur du temps qui est nécessaire pour qu'une molécule de chlorophylle ou de carotène passe de l'état fondamental à l'état excité à la suite de l'absorption d'un photon dont :

1) l'énergie $h\nu$ doit être égale à l'énergie séparant dans la molécule de chlorophylle l'orbitale moléculaire non occupée de plus basse énergie de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie ;

2) l'onde électromagnétique qui lui correspond doit avoir son vecteur électrique parallèle au moment de transition caractéristique de la transition d'énergie $h\nu$ considérée.

Echelle des temps

Le schéma ci-dessous est destiné à visualiser les évènements successifs se déroulant dans le chloroplaste et correspondant aux différentes conséquences possibles de l'absorption des photons par les pigments des chloroplastes.



La chronologie des réactions est établie en fonction du logarithme de l'inverse du temps qui s'est écoulé depuis l'instant où le photon a été absorbé, ce temps étant exprimé en secondes.

Très généralement ce n'est pas la première molécule de chlorophylle initialement excitée qui va être le siège d'une réaction chimique ou d'une ionisation. Le plus souvent l'énergie va être transférée de cette molécule excitée vers une autre molécule de chlorophylle mais non excitée, voisine et suivant un semblable processus excitonique, sans qu'il n'y ait jamais ionisation, l'énergie va se propager au sein d'un grand nombre de molécules de chlorophylle jusqu'à ce qu'elle soit finalement captée au niveau d'une molécule de chlorophylle particulière dont on dit qu'elle joue le rôle de piège ou de trappe pour l'énergie et qui, elle, va, de par la nature même de son environnement, être le siège d'une ionisation.

L'efficacité de ces transferts dépend de la disposition relative des molécules au sein de l'assemblage qu'elles réalisent dans ce milieu structuré qu'est le granum.

Entre le moment où le photon est absorbé et celui où la séparation de charge a lieu, il s'écoule un temps qui est de l'ordre de 10^{-10} s. (Robinson, 1964) [1]. C'est seulement à partir de ce moment que l'on va pouvoir observer non plus une migration d'énergie mais une migration de charge. Cette migration de charge se fait dans deux sens :

1) <u>de la trappe vers un premier accepteur d'électron</u> non identifié, mais que l'on désigne par la lettre Q (initiale de quencher). Duysens [2] a en effet montré que ce composé Q étant capable, lorsqu'il était à l'état oxydé, d'accepter un électron en provenance de la chlorophylle "trappe" diminuait la probabilité de retour de l'électron vers la trappe et par là même faisait diminuer ("quenchait") l'intensité de la fluorescence, conséquence de la recombinaison de charges. A partir de ce "quencher" l'électron va pouvoir à l'obscurité parcourir une chaine de transporteurs d'électrons de potentiel croissant que nous étudierons en détails ci-dessous.

2) <u>La trappe</u> après ionisation étant <u>devenue chargée positivement</u> acquiert une affinité électronique telle qu'<u>une migration d'électron se fait vers elle</u> à partir de composés non encore identifiés avec certitude mais parmi lesquels se situerait le cytochrome b_{559}.

Comme nous venons de l'indiquer très brièvement, c'est par des mesures d'intensité de fluorescence de la chlorophylle que l'on rend compte de l'état d'oxydo-réduction du composé Q , premier accepteur de l'électron libéré à la suite de l'absorption d'un photon par une quelconque molécule de chlorophylle.

Du fait même que la plupart des transporteurs d'électrons ont, sous forme réduite, un spectre d'absorption différent de celui qu'ils présentent sous forme oxydée, des mesures de spectroscopie différentielle et de spectroscopie d'éclair (Witt [3], Chance [4]) ont permis de suivre le trajet moléculaire parcouru par cet électron à partir de Q red. C'est ainsi qu'au cours de la période d'obscurité suivant immédiatement un éclair très intense dont la durée est de l'ordre de 10^{-7} s, les plastoquinones (PQ.) oxydées commencent par être réduites par Q red.

$E_o\ PQ^* = 0$ [5] PQ ox + Q red $\longrightarrow$ PQ red + Q ox

La cinétique de cette réaction est suivie par l'observation des variations de densité optique à 2600 Å , la plastoquinone réduite présentant une bande d'absorption à 2600 Å.

Ensuite cette plastoquinone réduite va céder un électron au cytochrome f oxydé soit directement, soit par l'intermédiaire du cytochrome b_6.

E_o cyt f = 365 mV [6] PQ red + cyt f ox $\longrightarrow$ PQ ox + cyt f red

Enfin la dernière étape de cette migration d'électron est la réduction par le cytochrome f réduit d'un pigment particulier présentant un maximum d'absorption au voisinage de 7000 Å et appelé pour cette raison P_{700} .

cyt f red + P_{700} ox $\longrightarrow$ cyt f ox + P_{700} red

avec $E_o\ P_{700}$ = 430 mV [7].

---

* Note : les abréviations utilisées dans le texte se trouvent pg. 136 .

La description qui précède rend compte de la migration d'électron se déroulant sans intervention de la lumière le long d'une chaine de transporteurs d'électrons dont le premier maillon est le "quencher" de Duysens et le dernier le P_{700} . Tout se passe comme si compte tenu des E_o des différents intermédiaires on observait la réduction du P_{700} oxydé par Q réduit.

Pour que les électrons puissent parvenir au NADP via la ferredoxine, un second acte photochimique est nécessaire qui concerne les molécules de chlorophylle situées au voisinage de P_{700} et dont l'excitation (consécutive à l'absorption d'un second photon) aboutit à l'ionisation du P_{700}. Le P_{700} jouant le rôle de trappe pour l'énergie captée par l'ensemble des molécules de chlorophylle qui constituent ce qu'on appelle le système I.

Ainsi P_{700} red + ferredoxine ox $\xrightarrow{h\nu}$ P_{700} ox + ferredoxine red

avec E_o ferredoxine = - 432 mV [8]

Par la suite la ferredoxine réduite cèdera un électron au NADP oxydé et on aura finalement :

ferredoxine red + NADP ox $\longrightarrow$ ferredoxine ox + NADP red

avec E_o NADP = - 320 mV [9]

Les longueurs d'onde efficaces pour la réduction du "Quencher" et des plastoquinones et finalement du P_{700} sont toutes celles comprises entre 4000 Å et 7000 Å. Ce sont elles qui excitent le système II.

Les longueurs d'onde efficaces pour l'oxydation du P_{700} et la réduction du NADP qui en est la conséquence sont comprises entre 4000 Å et 7500 Å.

Il importe de souligner que l'hypothèse de l'existence des deux systèmes est loin d'être admise par tous les chercheurs. Une des raisons pour lesquelles cette hypothèse des deux systèmes photochimiques distincts est controversée, réside dans le fait que l'on est pour le moment incapable de préciser les conditions qui font qu'un photon de longueur d'onde comprise entre 4000 Å et 7000 Å est absorbé préférentiellement par les molécules de chlorophylle appartenant au système I ou au contraire par celles appartenant au système II.

Ce schéma, dit schéma en Z, résume une hypothèse émise en 1960 par R. Hill [10].

Chemin suivi par l'électron dans les réactions de photosynthèse, suivant l'hypothèse de R. Hill (Schéma en Z).

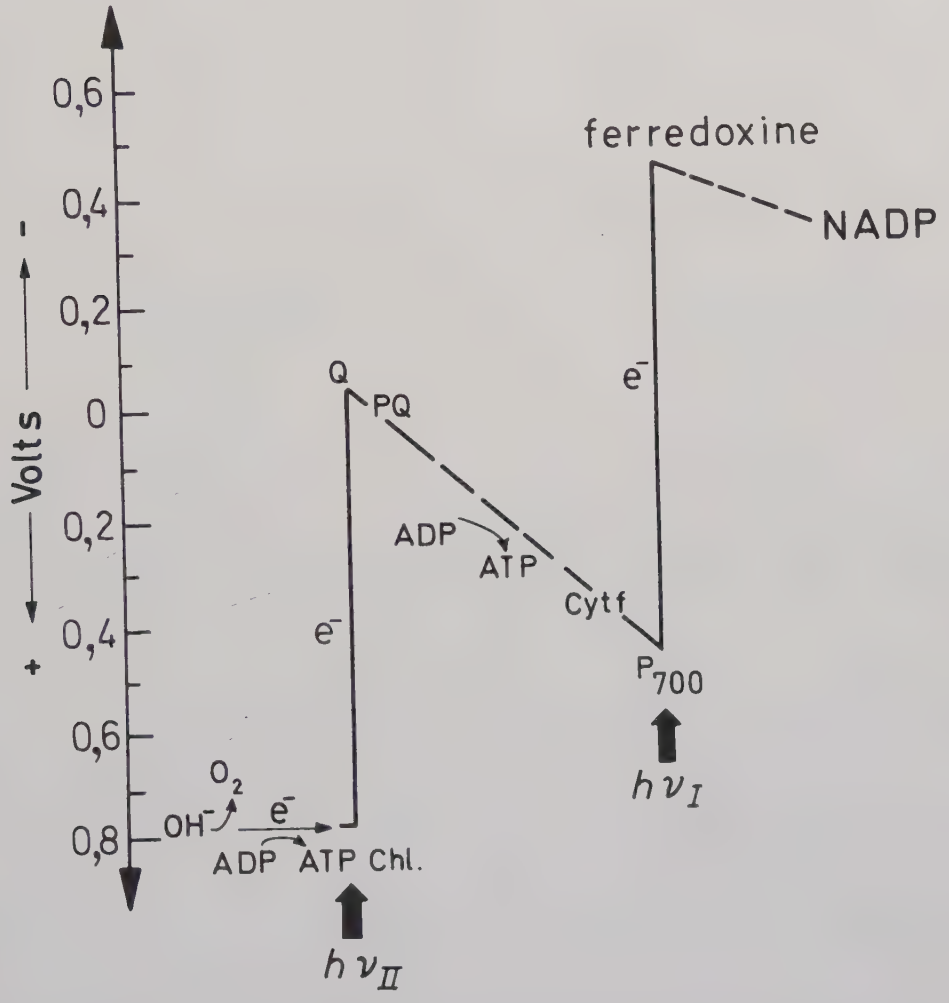


Fig. 1

C'est dans le cadre de cette hypothèse qu'Arnon a situé les réactions de photophosphorylation cycliques et non cycliques, c'est à dire de synthèse d'ATP se déroulant à la lumière, au sein de chloroplastes isolés, en suspension dans le milieu de composition appropriée.

Ce sont ces réactions de synthèse d'ATP qui font l'objet de l'étude que nous avons poursuivie en employant comme matériel des chloroplastes isolés de feuilles d'épinards.

HISTORIQUE.

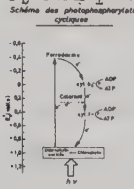
LIPMANN, (1938), montre que l'hydrolyse de l'ATP libère 9 Kcal./mole.

EMERSON, (1942), émet l'hypothèse qu'en photosynthèse l'énergie du photon se retrouve dans l'énergie des liaisons phosphate , riches en énergie.

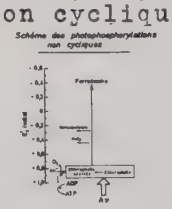
CALVIN, (1948-1955), élucide le trajet moléculaire suivi par le carbone du CO_2. L'assimilation du CO_2 peut se faire à l'obscurité, à condition que l'on fournisse à la cellule chlorophylienne de l'ATP et du NADPH.

ARNON, (1954-1960), montre que les chloroplastes isolés sont capables d'effectuer les réactions de photophosphorylation.

Photophosphorylations cycliques



Photophosphorylations non cycliques



COHN, (1953) et AVRON, (1960), montrant, que l'oxygène reliant le groupement phosphoryl terminal de l'ATP au squelette de l'ADP provient de l'ADP et non pas de l'orthophosphate.

JAGENDORF, (1963), met en évidence les deux étapes de la réaction de photophosphorylation, l'une se déroulant à la lumière, l'autre à l'obscurité.

$$\text{énergie } (h\nu) + X \xrightarrow{PMS} X_e$$ (réaction provoquée par la lumière)

$$X_e + Pi \longrightarrow {\sim}Pi + X$$

$$Pi + ADP \longrightarrow ATP$$ (réactions se déroulant à l'obscurité)

JAGENDORF, (1965), obtient à l'obscurité une synthèse d'ATP, par variation du pH de la suspension de chloroplastes : X_e' .

JAGENDORF, (1964), montre que la lumière induit une variation de pH dans une suspension de chloroplastes : $\triangle$pH .

THEORIES ACTUELLES sur les mécanismes d'activation de l'ion orthophosphate.

Théorie chimique, (1953-1954), CHANCE, LEHNINGER, SLATER.
Théorie chimiosmotique, (1961), MITCHELL.

II - HISTORIQUE

En 1938 Lipmann [11] montra que l'hydrolyse de l'ATP en ADP et PO_4H_3 libérait une énergie considérable, de l'ordre de 9 Kcal/mole. Ce fait traduisait l'existence d'une liaison relativement faible entre le groupement phosphoryl terminal de l'ATP et le squelette ADP et permettait de comprendre pourquoi l'ATP jouait le rôle de donneur de groupement phosphoryl à tous les composés de la cellule dont certaines étapes du métabolisme nécessitait leur existence sous forme phosphorylée (oses, acides aminés, etc.).

A la suite de cette découverte fondamentale de Lipmann, Emerson [12] dès 1942 émit l'hypothèse que dans la photosynthèse l'énergie du photon devait se retrouver dans l'énergie des liaisons phosphates riches en énergie. Mais il fallut attendre 1948-1955 pour que cette hypothèse soit confirmée. C'est en effet à cette époque que Calvin [13] élucida le trajet moléculaire (Molecular path) suivi par le carbone du CO_2 depuis son entrée dans la cellule jusqu'à son incorporation au sein de molécules d'oses ou d'acides aminés.

Du point de vue qui nous intéresse ici, Calvin et son équipe montrèrent en particulier que l'assimilation du gaz carbonique par des cellules chlorophylliennes pouvait se faire parfaitement bien à l'obscurité à la seule condition que l'ATP et le NADPH leur soient fournis en permanence, d'une part pour permettre la synthèse du ribulose diphosphate, accepteur du CO_2 et d'autre part pour rendre possible la réduction de l'acide phosphoglycérique en glycéraldéhyde phosphate.

L'intervention de la lumière apparaissait ainsi avoir pour conséquence biochimique la synthèse de l'ATP et celle du NADPH. Dès lors le problème crucial de la photosynthèse qui pendant plus d'un siècle avait été de déterminer la nature de l'accepteur du CO_2 et celle du premier produit auquel ce CO_2 donnait naissance, se transformait pour devenir le suivant : par quels mécanismes l'absorption de l'énergie électromagnétique de la lumière par les molécules de chlorophylle et de caroténoides entraine-t-elle la synthèse d'ATP et de NADPH ?

C'est précisément à cette question que nous avons cherché à apporter quelques éléments nouveaux de réponse à la suite des travaux d'Arnon, Jagendorf, M. Cohn et Avron.

Travaux d'Arnon

L'addition d'ADP à une solution d'orthophosphate n'a jamais pour conséquence la formation d'ATP, celle-ci par contre fut observée par Arnon [14, 15] . Lorsque l'ADP et l'orthophosphate étaient ajoutés à des chloroplastes fortement éclairés et en suspension dans un milieu dont la composition initiale était la suivante :

tampon tris (hydroxyméthyl amino méthane)	0,13 M, pH 7,2
NaCl	0,35 M
ascorbate de sodium	3,3 mM
acide adénylique	3,3 mM
PO_4H_2K	6,6 mM
suspension de chloroplastes contenant	2 mg de chloroph.
volume final	3 ml.
phase gazeuse	air ou azote

C'est après plus de quinze ans de recherches qu'Arnon mit au point empiriquement ce milieu dont le pH était 7,2 et le potentiel d'oxydo-réduction voisin de zéro. Cette dernière détermination étant évidemment faite lorsque la phase gazeuse est constituée par de l'azote.

Les rendements observés pour la formation de l'ATP étaient faibles et ce milieu fut considérablement amélioré par la suite, en particulier par addition d'ions Mg^{++} et de cofacteurs tels que les riboflavines phosphate, la ménadione ou la phénazine métosulfate.

Cependant dès 1954, Arnon, Allen et Whatley [14, 15, 16] mettent en évidence les principales caractéristiques des "photo-phosphorylations" :

1) Elles se déroulent indépendamment de toute participation de la chaine respiratoire ; en effet les suspensions de chloroplastes isolés par Arnon ne contiennent pas de mitochondries puisque les essais de phosphorylation oxydative à l'obscurité se révèlent être négatifs. Les chloroplastes ne consomment ni l'oxygène, ni substrat et des analyses ultérieures ont montré qu'ils ne

contiennent pas le dernier enzyme de la chaine respiratoire, la cytochrome oxydase [17, 18, 19]. Ces suspensions de chloroplastes permettent donc d'étudier isolément les réactions photochimiques ayant pour conséquence la formation d'ATP.

2) La synthèse d'ATP est indépendante de l'assimilation du gaz carbonique car :

   a - elle se fait avec le même rendement dans un milieu dont tout le CO_2 a été chassé ;

   b - elle s'observe à partir des seules fractions chloroplastiques contenant les pigments, c'est à dire les grana ; le stroma renfermant la ribulose diphosphate carboxylase, en est absent.

3) La lumière est la seule source d'énergie utilisée par les chloroplastes.

Cette découverte faite par Arnon et son équipe d'une synthès d'ATP, obtenue avec des chloroplastes isolés, et dépendante de la lumière, mais indépendante de la présence de gaz carbonique et d'oxygène, mettait fin à l'hypothèse de Warburg [20]. Selon cet auteur, en effet, tout l'ATP formé dans les réactions de photosynthèse n'était en fait produit que par les phosphorylations oxydatives.

Photophosphorylations non cycliques

Ainsi dès cette époque l'analogie était établie entre cette synthèse d'ATP dont à la lumière et en suspension dans un milieu approprié les chloroplastes isolés sont le siège et les phosphorylations oxydatives caractéristiques des mitochondries. Dans ce dernier cas une migration d'électrons a lieu à partir de substrats spécifiques vers l'oxygène le long d'une chaine de transporteurs d'électrons, alors que dans le chloroplaste comme nous venons de le voir dans l'introduction c'est la lumière qui provoque un déplacement de charges de la trappe du système II vers le NADP via les plastoquinones, le cytochrome b_6, le cytochrome f, le P_{700} et la ferredoxine.

Schéma des photophosphorylations non cycliques

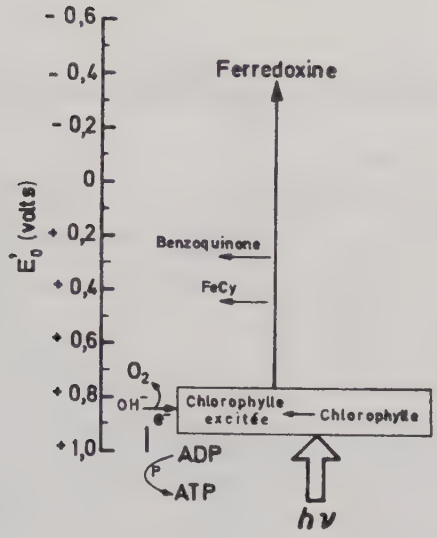


Fig. 2

Schéma des photophosphorylations non cycliques (Arnon 1965 [21])

A ce transfert intragranaire d'électrons photoinduit est stoechiométriquement liée une synthèse d'ATP. En effet, si on ajoute à la suspension de chloroplastes un accepteur d'électrons tel que le ferricyanure ou le NADP, la quantité d'ATP formé est proportionnelle à la quantité d'oxydant réduit et d'oxygène dégagé. Ainsi les électrons qui réduisent $NADP^+$ sont ceux-là mêmes dont la migration à partir de la trappe du système II a pour conséquence la synthèse d'ATP, cette dernière semblant être localisée entre le "Quencher" de Duysens et le P_{700}. Arnon, Whatley et Allen [22], Krogman, Jagendorf et Arnon [23], Good [24], Stiller et Vennesland [25], ont montré qu'il existe un seul site de phosphorylation dans ces phosphorylations non cycliques, car le rapport $P/2e^- = 1$.

Toutes les lumières de longueurs d'onde comprise entre 4000 Å et 7000 Å dont l'absorption entraîne la réduction du NADP, sont également efficaces, dans ces réactions de photophosphorylation non cycliques.

Photophosphorylations cycliques

Un peu plus tard, en 1959, Arnon [26] montra que l'absorption de lumière de longueurs d'onde supérieures à 7000 Å dont on sait qu'elles ne sont plus capables de réduire le NADP avec un bon rendement quantique, entrainait cependant la formation d'ATP au sein d'une suspension de chloroplastes, à condition que soit présent un médiateur électrochimique du type pyocyanine dont le potentiel d'oxydo-réduction est de l'ordre de zéro. Compte tenu des conditions d'éclairement $7000 < \lambda < 7500$ Å il n'était plus question de faire intervenir une migration d'électrons à partir de la trappe du système II qui n'est pas sensible à ces longueurs d'ondes. Seul le système I est donc impliqué et Arnon suggéra que le médiateur électrochimique avait pour rôle d'accepter un électron de la ferredoxine réduite, le transférant ensuite à une des molécules composant la chaîne des transporteurs : le cyt b_6 ou le cyt f.

Il y aurait ainsi un transfert cyclique d'électrons directement par voie photochimique, du P_{700} réduit, vers la ferredoxine oxydée, puis de la ferredoxine réduite vers le P_{700} oxydé, via la pyocyanine, le cyt b_6, le cyt f et la plastocyanine.

C'est au cours de cette migration d'électron le long d'une fraction encore inconnue de la chaîne de transporteurs que l'ATP prend naissance et cette formation d'ATP est appelée photophosphorylation cyclique.

Ces photophosphorylations cycliques sont caractérisées par :

1) l'absence de dégagement d'oxygène,

2) leur insensibilité à la présence d'oxygène dans la phase gazeuse : les photophosphorylations se déroulent aussi bien en atmosphère d'azote pur qu'à l'air.

Schéma des photophosphorylations cycliques

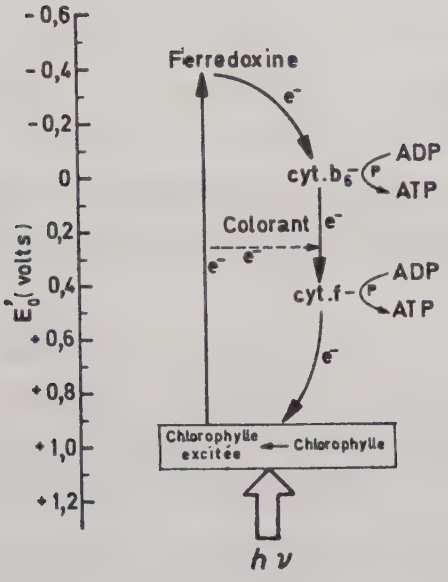


Fig. 3

Schéma des photophosphorylations cycliques (Arnon, 1965) [21]

Les deux sites de phosphorylation indiqués sur le schéma tiennent compte des différences de potentiel existant entre la ferredoxine et le cytochrome b_6 (-0,43 V et -0,06 V) et entre le cytochrome b_6 et le cytochrome f (-0,06 V et -0,365 V). Ces différences sont suffisantes pour permettre chacune une phosphorylation de l'ADP en ATP ($\triangle E_{ATP}$ = 9 Kcal = 0,392 V). Toutefois Arnon n'exclut pas la possibilité d'existence de sites additionnels.

Actuellement on évalue l'importance des phosphorylations cycliques en déterminant la quantité d'ATP synthétisé par heure et par milligramme de chlorophylle. Suivant la préparation de chloroplastes et le médiateur électrochimique utilisé, ces vitesses sont très variables. La vitesse la plus élevée obtenue par Jagendorf, avec des chloroplastes d'épinards en présence de phénazine méthosulfate, était de 900 µM ATP par heure et par milligramme de chlorophylle [27] ; avec des chloroplastes de Swiss Chard (feuilles de bettes)

Avron [28] obtient : 2500 µM ATP heure^{-1} mg^{-1} de chlorophylle.

Nous n'avons pour notre part, jamais obtenu des vitesses de photophosphorylation supérieures à 600 µM ATP heure^{-1} mg chlorophylle^{-1}.

Travaux de M. Cohn et M. Avron :

Détermination de l'origine de l'oxygène reliant le groupement phosphoryl terminal de l'ATP au squelette de l'ADP.

Après qu'Arnon eut mis en évidence les réactions de photophosphorylation cycliques et non cycliques et montré leur coexistence au sein des cellules chlorophylliennes, un premier progrès très important fut réalisé dans la compréhension du mécanisme de la formation de l'ATP à la suite des recherches entreprises indépendamment par M. Cohn dans le cadre des phosphorylations oxydatives et par M. Avron dans celui des photophosphorylations, sur l'origine de l'oxygène qui dans la molécule d'ATP fait le pont entre le groupement phosphoryl terminal et l'ADP.

A quelle molécule, ADP ou PO_4H_3, appartenait au départ cet oxygène ?

M. Cohn en 1953 [29] et M. Avron en 1960 [30] apportèrent la réponse en montrant par utilisation d'orthophosphate uniformément marqué à l'oxygène 18, que l'oxygène reliant les deux derniers groupements phosphate provient de l'ADP et non pas de l'orthophosphate. La synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et de l'orthophosphate se fait donc à la suite de l'activation du seul orthophosphate, ce dernier perdant un groupement OH.

C'est là un résultat essentiel qui est à la base de toutes les recherches ayant trait aux mécanismes des réactions aboutissant à la synthèse de l'ATP et d'ores et déjà permet de distinguer deux étapes dans cette dernière :

1) l'activation de l'ion orthophosphate que nous considérons à la suite de Todd [31] comme correspondant à la transformation de l'orthophosphate en métaphosphate monomère ;

2) la création de la liaison entre l'ADP et ce métaphosphate monomère, liaison qui donne naissance à l'ATP. Cette dernière réaction est enzymatique : elle se réalise à l'obscurité grâce à la présence d'un enzyme que Racker [32] a isolé et appelé "facteur de couplage". Cet enzyme isolé du chloroplaste, possède par ailleur une activité ATPasique en présence d'agents réducteurs.

Travaux de Jagendorf.

I. Séparation de l'étape se déroulant à la lumière de celle se déroulant à l'obscurité dans les photophosphorylations.

L'intérêt des expériences de Shen, 1962 [33] et de Jagendorf, 1963 [34], réside dans le fait qu'elles ont permis de séparer dans les photophosphorylations, les réactions nécessitant la lumière de celles se déroulant à l'obscurité.

Elles montrent de plus que les réactions nécessitant la lumière :

a) peuvent se dérouler en absence d'ions orthophosphate,

b) nécessitent la présence d'un médiateur électrochimique (PMS ou pyocyanine),

c) aboutissent à la formation et à l'accumulation au sein du granum du pouvoir d'activation de l'ion orthophosphate, c'est à dire compte tenu des résultats de M. Cohn et de M. Avron, à la création des conditions requises pour la transformation de l'orthophosphate en métaphosphate.

Les premières expériences de Shen et Shen [33] et de Hind et Jagendorf [34] ont été faites dans les conditions suivantes : les chloroplastes (ou les grana) sont éclairés en lumière blanche pendant 15 secondes. Ils sont en suspension dans un milieu dont le pH est compris entre 5,2 et 7,9 et dont la composition est la suivante :

Milieu I :
- chloroplastes contenant 250 µg de chlorophylle,
- tampon "GTA" (quantités équimolaires de Tris, 3,3-diméthyl-glutarate, et 2-amino, 2 méthyl-1,3-propanediol), 2,5 µM,
- pyocyanine 0,018 µM,
- NaCl 12,0 µM
- volume final à la lumière : 0,8 ml.

A la fin des 15 secondes d'éclairement, la suspension de chloroplastes est injectée dans un récipient maintenu à l'obscurité et contenant un milieu de pH compris entre 7 et 8,9 et dont la composition est la suivante :

Milieu II :
- ADP 3,0 µM,
- $^{31+32}Pi$ 0,5 µM,
- $MgCl_2$ 5,0 µM,
- tampon "GTA" 12,5 µM
- volume 0,7 ml, c'est à dire volume final à l'obscurité : 1,5 ml.

Après 30 secondes d'agitation à l'obscurité, Jagendorf ajoute 0,2 ml d'acide trichloracétique à 20 % pour arrêter la réaction. L'ensemble de la réaction est faite à la température de 3°C et sous air.

Dans ces conditions les auteurs observent une synthèse d'ATP. La quantité d'ATP synthétisé est la plus importante, lorsque le pH du premier milieu, dans lequel les chloroplastes sont éclairés, est 6 et le milieu final de la suspension de chloroplastes à l'obscurité est 8.

Lorsque le médiateur électrochimique (PMS ou pyocyanine) est absent pendant l'éclairement, la quantité d'ATP formé est 5% de celle qui prend naissance lorsque le même médiateur est présent dans le milieu I, soumis à l'éclairement.

Ainsi le mouvement des électrons initialement provoqué par l'absorption des photons par les molécules de pigments et rendu possible grâce à la présence du médiateur électrochimique a pour

conséquence la création à l'intérieur du granum d'une modification de la structure de ce dernier, ou de certaines molécules le composant, lui permettant d'acquérir la capacité de transformer l'orthophosphate en métaphosphate. C'est précisément cette capacité acquise par le granum à la suite de l'éclairement que Jagendorf a désignée par X_e.

L'injection dans le milieu II des chloroplastes qui viennent d'être éclairés dans le milieu I, permet de révéler par la formation d'ATP, cette capacité d'activation de l'orthophosphate acquise lors de l'éclairement de la suspension dans le milieu de bas pH.

Hind et Jagendorf [34] montrent que la durée de vie de "X_e" très faible à pH 7,8 (2 secondes) est plus grande et optimale à pH 6 (30 s).

On peut supposer que les différentes étapes se déroulent suivant les trois équations :

$$\text{énergie}(h\nu) + X \xrightarrow[\text{pH 6}]{\text{PMS}} X_e$$

réaction provoquée par la lumière

$$X_e + Pi \longrightarrow \sim Pi + X$$

$$\sim Pi + ADP \xrightarrow{\text{pH 8}} ATP$$

réactions se déroulant à l'obscurité

(X étant un site ou un médiateur, contenu dans le chloroplaste).

Jagendorf conclut dans sa première publication (1963) [34], que l'intermédiaire activé X_e :

1) n'est pas un composé phosphorylé riche en énergie, puisque

   a - l'addition de phosphate dans la phase lumineuse n'a pas d'effet sur la phosphorylation de l'ADP pendant la phase obscure ;

   b - l'arseniate n'a pas d'action inhibitrice plus grande lorsqu'il est ajouté pendant la phase lumineuse que pendant la phase obscure ;

2) n'est pas une entité dont la formation dépend d'une réaction purement photochimique (comme le P_{700} ou la chlorophylle oxydée) puisque la vitesse de sa formation dépend de la température ($Q_{10} = 2$) ;

3) n'est pas une forme activée du médiateur électrochimique (pyocyanine puisque le rapport $P/2e^-$ diminue lorsqu'on augmente la concentration de la pyocyanine (pyo : $10^{-6} \longrightarrow P/2e^- = 5$; pyo : $10^{-4} \longrightarrow P/2e^- = 0,075$).

II. Synthèse d'ATP obtenue entièrement à l'obscurité par seule variation de pH de la suspension de chloroplastes .

En 1965 Jagendorf et Uribe [35] obtiennent une synthèse d'ATP sans apport d'énergie lumineuse. Nous avons observé la même réaction à la même époque (1965). Cette réaction se fait en deux étapes. Dans un premier temps la suspension de chloroplastes dans le saccharose, maintenue à l'obscurité, est amenée à pH acide, (variant de pH 3,8 à 7,2) avec un tampon approprié ; après 60 secondes, cette suspension est injectée, toujours à l'obscurité, dans un milieu contenant l'ADP, $^{31+32}Pi$, $MgCl_2$ et le tampon Tris-HCl en quantité suffisante et à pH convenable pour amener la suspension de chloroplastes à pH 8. On observe une synthèse d'ATP d'autant plus importante que le pH du premier milieu est plus proche de 3,8 ; à pH inférieur, la suspension de chloroplastes précipite. Par contre, si l'on ne fait pas varier le pH de la suspension de chloroplastes : soit que l'on maintienne pendant toute la durée de la réaction le pH acide, soit que l'on maintienne le pH à 8, on n'observe aucune synthèse d'ATP.

Les auteurs ont employé divers tampons acides (phtalate, glutamate, succinate) pour amener les chloroplastes au pH acide voulu, ou bien simplement de l'acide chlorhydrique. Dans tous les cas la quantité d'ATP synthétisé la plus importante était obtenue lorsque c'était le tampon succinate qui était employé. Ils observèrent une quantité dix fois supérieure lorsque c'était l'acide succinique

(190 mμM ATP/mg chlorophylle) que lorsque c'était l'acide chlorhydrique (18 mμM ATP/mg chlorophylle) qui servait à acidifier la suspension de chloroplastes, toute condition égale par ailleurs.

Une étude ultérieure par Uribe et Jagendorf [36], montre que l'acide succinique pénètre dans le chloroplaste sous forme non dissociée (pH 4) beaucoup mieux que sous forme ionique (pH 6,5). Au moment de la variation de pH, une fraction de l'acide est retenue sous forme ionisée, et ne peut plus quitter le chloroplaste, puisque sous cette forme les membranes ne lui sont pas perméables.

Ces auteurs ont étudié l'action d'un grand nombre d'acides [37]. Ils ont observé que les plus efficaces étaient les acides dicarboxyliques en C_4 ou C_5. Ils émettent l'hypothèse que l'acide non dissocié fonctionne comme transporteur de protons vers l'intérieur des membranes du granum.

Dans la suite de cet exposé nous appellerons "X'_e" l'intermédiaire activé par seule variation de pH à l'obscurité.

III. Variation de pH induite par la lumière dans une suspension de chloroplastes ($\triangle$pH)

Cette réaction fut découverte à la suite de l'hypothèse émise par Mitchell en 1961 [38] suivant laquelle il suggère que l'énergie nécessaire à la phosphorylation provient du gradient de protons existant entre l'extérieur et l'intérieur d'une membrane (chloroplastique ou mitochondriale). Ce gradient de protons serait induit par le transfert d'électrons, lui-même provoqué par l'énergie lumineuse absorbée par les pigments du chloroplaste.

Cette théorie fit prédire à Jagendorf et Hind [39] que dans les conditions où les particules accumulaient un intermédiaire (X_e) riche en énergie, on devait observer dans le milieu environnant, une élévation de pH puisqu'il s'établissait un gradient de protons de l'extérieur vers l'intérieur des membranes. C'est ce que Neumann et Jagendorf [40] observèrent avec des chloroplastes éclairés dans un milieu à pH 6, non tamponné.

Les grana mis en suspension dans du NaCl 0,01 M non tamponné, sont éclairés en lumière blanche en présence de pyocyanine et les variations de pH consécutives à l'éclairement, enregistrées. Les auteurs observèrent une élévation du pH du milieu extérieur pouvant atteindre une unité pH. La quantité de protons fixés :

1) est proportionnelle à la concentration du milieu en chlorophylle (jusqu'à une concentration de 150 µg de chlorophylle par ml),

2) dépend de la quantité de pyocyanine présente dans le milieu (maximum atteint pour une concentration de $2,10^{-5}$M),

3) dépend du pH initial de la suspension de chloroplastes (optimum entre pH 6 et 6,5),

4) dépend de l'intensité lumineuse.

Lorsque la lumière est supprimée, le pH de la suspension revient au pH initial ; le phénomène est réversible. On peut éclairer la suspension, puis éteindre la lumière et recommencer, la variation de pH s'observe à nouveau. Une similitude de comportement des chloroplastes envers l'établissement du $\triangle$pH et de l'apparition de X_e est observée. En effet la pyocyanine est le cofacteur électrochimique qui permet un $\triangle$pH plus important que la vitamine K_3 ou le FMN [40]. Les inhibiteurs des phosphorylations, tels que les ions NH_4^+ ou l'EDTA sont des inhibiteurs puissants de la fixation des protons [40].

Théories actuelles sur les mécanismes d'activation de l'ion orthophosphate

I. Théorie chimique

II. Théorie chimiosmotique

I. Théorie chimique

La théorie chimique primitivement conçue pour expliciter les relations qui existent dans les phosphorylations oxydatives entre le transfert de charge de la chaine respiratoire et la formation d'ATP a vite été étendue aux photophosphorylations.

Cette théorie élaborée en 1953-54 par Chance [41], Lehninger [42], Slater [43], postule l'existence d'un intermédiaire commun au transport d'électrons et à la formation d'ATP, (plus précisément à l'activation de l'ion orthophosphate). Elle s'inspire du mécanisme observé dans les phosphorylations liées au substrat, tel celui de l'oxydation du glycéraldéhyde phosphate en acide phosphoglycérique, réaction catalysée par la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase. Ici l'acide 1-3 diphosphoglycérique est l'intermédiaire commun aux deux réactions : d'oxydo-réduction et de phosphorylation.

Contrairement aux phosphorylations liées au substrat, les phosphorylations oxydatives et les photophosphorylations ne sont observées que dans les systèmes où il existe une structure membranaire. Les auteurs de cette théorie, s'inspirant des réactions connues dans les réactions de phosphorylation liées au substrat postulent l'existence d'un intermédiaire faisant partie de la structure membranaire, capable d'être le siège à la fois d'une réaction d'oxydo-réduction et d'une phosphorylation (nous désignons par le terme de phosphorylation la fixation d'un ion orthophosphate, sous forme d'un intermédiaire phosphorylé riche en énergie $X \sim P$). Cet intermédiaire fait nécessairement partie de la chaîne des transporteurs d'électrons, ceux-ci étant des composés liés à la structure membranaire et par définition le siège de réactions d'oxydo réduction. C'est lors du passage de l'état réduit à l'état oxydé de l'un des transporteurs d'électrons et au niveau même de ce transporteur que serait activé l'ion orthophosphate. Slater [44] a montré que la plupart des schémas des réactions de phosphorylation pouvaient être classés en deux catégories appelées : mécanismes du type I et du type II.

Le mécanisme du type I postule l'existence d'un intermédiaire non phosphorylé C, (appelé aussi par différents chercheurs : X ou I)

et c'est cet intermédiaire qui se combinerait avec le transporteur d'électrons en donnant un composé riche en énergie (A∿C). Cet intermédiaire agirait alors sur l'orthophosphate et l'ADP et permettrait la synthèse de l'ATP, suivant le schéma :

$$AH_2 + B + C \rightleftharpoons A\sim C + BH_2$$

$$A\sim C + Pi + ADP \rightleftharpoons A + C + ATP$$

Le mécanisme du type II postule une activation directe du phosphate par un donneur d'électrons et d'hydrogène (AH_2), la formation d'un intermédiaire phosphorylé riche en énergie (A∿P), pendant qu'un accepteur d'électron et d'hydrogène (B) est réduit. C'est le composé phosphorylé qui, dans une étape ultérieure et en présence d'ADP, permettrait la synthèse de l'ATP :

$$AH_2 + B + Pi \rightleftharpoons A\sim P + BH_2$$

$$A\sim P + ADP \rightleftharpoons A + ATP$$

Jusqu'à présent ni l'un ni l'autre des deux mécanismes n'a reçu de confirmation. On n'a pas encore pu isoler d'intermédiaire activé, phosphorylé ou non, faisant partie de la chaîne des transporteurs d'électrons.

II. Théorie chemiosmotique

En 1960, Robertson [45] élabore une théorie concernant le transport actif des ions à travers des membranes. Mitchell en 1961 [38], élargit ce concept aux mitochondries et aux chloroplastes, et rattache les phosphorylations au transport d'ions et aux déplacement d'électrons dont ces membranes sont le siège.

Cette théorie repose sur deux faits expérimentaux :

1) la synthèse de l'ATP est accompagnée de la libération d'une molécule d'eau (ou d'ion OH^- si l'on opère à un pH convenable),

2) l'ion orthophosphate est activé avant de se fixer sur l'ADP en perdant un groupement OH ($HPO_4^{=} \rightleftharpoons PO_3^{-} + OH^{-}$), puisque l'oxygène qui unit les deux derniers groupements phosphate de l'ATP provient de l'ADP [21, 22].

Mitchell suppose en plus que la réaction :

$$A_{red} + B_{ox} + ADP + H_3PO_4 \rightleftharpoons ATP + H^+ + OH^- + A_{ox} + B_{red}$$

est une réaction d'équilibre dont le sens est déterminé par la teneur en eau (ou en ses constituants : H^+ et OH^-) au voisinage du site actif de l'enzyme catalysant soit l'hydrolyse soit la synthèse de l'ATP. Enzyme que Mitchell appelle ATPase *.

En présence d'eau : ATP $\longrightarrow$ ADP + Pi
En absence d'eau : ADP + Pi $\longrightarrow$ ATP

Pour rendre compte de la synthèse de l'ATP, Mitchell s'est efforcé d'imaginer un mécanisme permettant un appauvrissement en eau à proximité de l'enzyme catalysant la synthèse de l'ATP.

Pour Mitchell la lamelle est constituée par une couche lipidique séparant deux couches protéiques hydrophyles. Cette couche imperméable à l'eau contient à sa périphérie, d'un seul des deux côtés de la membrane, l'enzyme catalysant soit l'hydrolyse soit la synthèse de l'ATP suivant la réaction d'équilibre :

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons Pi + ADP$$

Un des rôles de la structure lipoprotéique de la membrane serait de permettre le transport de l'eau sous forme de ses éléments ionisés : $2H^+$ et $O^=$, à travers la membrane, et de permettre un appauvrissement en eau au voisinage de l'ATPase qui fait se déplacer la réaction d'équilibre dans le sens de la synthèse de l'ATP.

Le transfert orienté des hydrogènes, à travers la membrane hydrophobe du côté ou se trouve"l'ATPase" au côté opposé, dépendrait de systèmes de transhydrogénation (quinones : plastoquinones, coenzyme Q ou flavoprotéines). Après éjection des protons d'un des côtés de la membrane,les électrons seraient véhiculés par des transporteurs d'électrons tels que les cytochromes. Ainsi il

* le Nom d'ATPase utilisé par Mitchell est un abus de langage, car l'ATPase catalyse l'hydrolyse de l'ATP mais non pas sa synthèse.

existerait un couplage entre le mouvement des électrons et celui des hydrogènes dans la membrane.

Le transfert d'ions oxygène O^{2-} à partir du côté où se trouve l'ATPase se ferait par l'intermédiaire d'un ou plusieurs transporteurs que Mitchell nomme XI passant par la forme de $X^{-} + IO^{-}$ pour être libéré du côté opposé. L'oxygène serait donc transporté du même côté de la membrane que celui où sont libérés les hydrogènes sous forme de protons et neutraliserait ces derniers. Ainsi de l'eau serait éliminée au voisinage de l'ATPase par le passage de ses constituants vers le côté de la membrane où cet enzyme est absent.

La théorie de Mitchell permet donc d'expliquer aussi bien chez les mitochondries que chez les chloroplastes la relation qui existe entre les variations de potentiel redox des transporteurs d'électrons et la synthèse d'ATP.

Etudes poursuivies dans ce travail

Le présent travail concerne essentiellement l'étude des deux premières étapes des phosphorylations, c'est à dire :

- la formation et le stockage des états activés (états X_e, X'_e et $X \sim P$) dans les lamelles chloroplastiques,

- l'activation de l'ion orthophosphate.

Nous nous sommes particulièrement attachés à étudier la genèse des différentes formes phosphorylées ou non de cet état activé, qui précède la synthèse de l'ATP ; de les comparer entre elles ; puis de montrer que la fixation des protons par les lamelles chloroplastiques avait pour effet de faire se conserver un de ces états activés, mais ne participait pas directement à la synthèse de l'ATP.

III. TECHNIQUES ET METHODES

A) CHOIX DU MATERIEL

Pour étudier les photophosphorylations nous avons utilisé des chloroplastes extraits de feuilles d'épinard. On peut stocker ces feuilles, sans inconvénient, pendant plusieurs jours dans une chambre froide (4°C) avant de les utiliser.

Les chloroplastes isolés sont un matériel biologique de choix, car 1) c'est à leur niveau que se déroulent les réactions photochimiques (photophosphorylations, réduction du NADP),

2) isolés du milieu cytoplasmique de la feuille, on ne peut confondre les réactions qui se déroulent à leur niveau, avec celles des mitochondries, en particulier les phosphorylations oxydatives. Ceci est contrôlé en effectuant des réactions témoins à l'obscurité.

La figure 4 représente une photo au microscope électronique d'un chloroplaste. Nous y distinguons des empillements de lamelles, composés de pigments, de lipides et de protéines, qui sont les grana qui baignent dans un environnement protéique appelé stroma, essentiellement constitué par l'enzyme nécessaire à la fixation du gaz carbonique sur le ribulose diphosphate.(46).

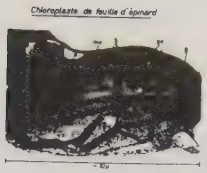
Dans le travail que nous poursuivons, nous utilisons soit des chloroplastes "entiers", soit des chloroplastes "cassés" ou grana.

Les chloroplastes "entiers" contiennent une fraction importante de stroma ; les chloroplastes "cassés " ou grana, ne contiennent que les empilements de membranes thylakoides responsables de toutes les réactions photochimiques et une faible proportion de stroma.

Les chloroplastes isolés (entiers ou cassés) sont capables d'accomplir certaines des réactions se déroulant à leur niveau dans la feuille entière, à condition de leur fournir les substrats nécessaires,(ferredoxine et NADP pour la réduction du NADP; ADP et Pi et un médiateur éléctrochimique pour obtenir la synthèse d'ATP).

TECHNIQUES ET METHODES

A. Choix du matériel : chloroplastes d'épinards ⟶



B. Extraction des chloroplastes.

C. Photophosphorylations en deux temps:

appareillage — composition des milieux

I		II	
chloroplastes	1mg chl.	Tris	70µM pH8
$MgCl_2$	10 à 100µM	ADP	5µM
Pyocyanine	5.10^{-2} µM	Pi	5 à 200µM
Ac.succinique	5µM	^{32}P	5 µ 150µCi

D. Phosphorylations par variation de pH, se déroulant à l'obscurité.

E. Techniques d'éléctrophorèse (haute tension)

- appareil utilisé
- composition du tampon

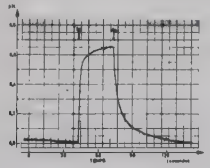
F. Autoradiographie ⟶

G. Techniques de détermination de la radioactivité.

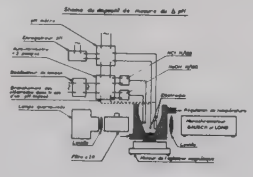
H. Evaluation quantitative des composés phosphorylés.

I. Mesure du ΔpH :

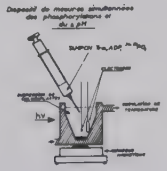
- enrégistrement de la variation de pH



- schéma de l'appareillage



- mesure simultannée du ΔpH et des photophosphorylations



J. Critique des méthodes.

Chloroplaste de feuille d'épinard

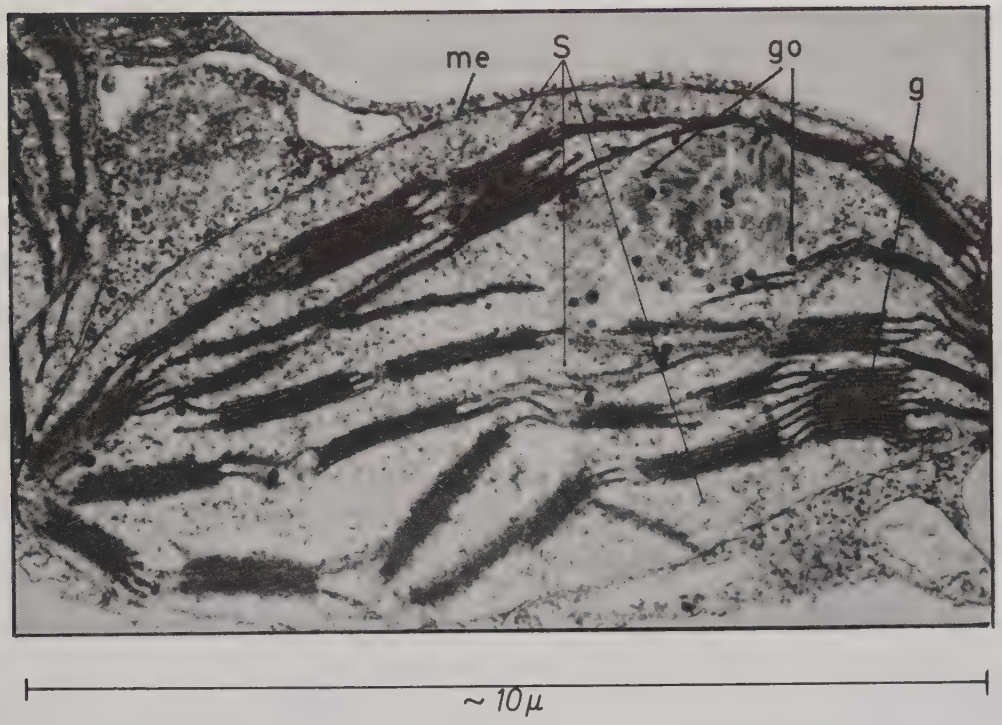


Fig. 4

me : membrane externe.

s : stroma.

go : granules osmiophiles.

g : granum.

Nous devons souligner que les réactions étudiées sur des particules isolées de feuilles, que sont les chloroplastes, peuvent être divisées en deux catégories. Les réactions photochimiques primaires, qui se déroulent de façon identiques à celles qui ont lieu dans une feuille, et les réactions secondaires non photochimiques, se déroulant à l'obscurité, donc ni les cinétiques, ni les besoins en substrats, ni les quantités de produits accumulés ne peuvent être comparés avec celles se déroulant dans une feuille. Seuls les produits de la réaction sont les mêmes qualitativement.

B) EXTRACTION DES CHLOROPLASTES (technique modifiée de Jagendorf (34)

- 250 g de feuilles d'épinards sont dilacérées, après élimination de la nervure centrale. On les broye mécaniquement pendant 30 secondes à la chambre froide dans 125 ml de solution tampon dont la température est voisine de 0°C. La composition de la solution tampon est la suivante :

Tris-(hydroxyméthyl-aminométhane)-HCl 0,02 M pH 7.8,
Saccharose 0,4 M

Le broyat est filtré à travers 8 couches de gaze et le filtrat soumis aux centrifugations suivantes :

La provenance des produits utilisés est la suivante:
Tris-(hydroxyméthyl-aminométhane (pro analysi): E. Merk, A.G.Darmstad
Saccharose (qualité pour ampoules) : " "
Acide succinique (pour analyse) : U.C.B.(Union chim. bel
Pyocyanine, préparée par photo-oxidation du PMS (phénazine méthosulphate) : Sigma chemical company
ADP (Grade I) " " "
^{32}P neutre pharm. : C.E.A.Dép.des radioélé

1er filtrat broyage

Centrifugé 5 minutes, 200 xg

- Culot rejeté
- Surnageant centrifugé 15 minutes, 600 xg à 4°C
  - Culot repris dans un homogénéiseur de Potter en verre, homogénéisé avec 50 ml de saccharose 0,4M. Centrifugé 15 minutes, 600 xg à 4°C
    - Culot repris une deuxième fois dans 50 ml de saccharose 0,4 M(comme ci-dessus) Centrifugé 15 minutes, 600 xg à 4°C
      - Culot
        - Culot + 80 ml eau distillée 30 minutes à 4°C, obscurité Centrifugé 15 minutes à 20 000 xg
          - Culot + 10 cm^3 saccharose 0,4 M constitue les <u>chloroplastes "cassés"</u>,(ou grana).
          - Surnageant rejeté
        - Culot repris dans 10 ml de saccharose 0,4 M : constitué les <u>chloroplastes</u> "<u>entiers</u>"
      - Surnageant rejeté
    - Surnageant rejeté
  - Surnageant rejeté

C) PHOSPHORYLATIONS EN DEUX TEMPS (du type Jagendorf : formation de X_e à la lumière à pH acide, synthèse d'ATP à l'obscurité à pH 8).

Appareillage

Il se compose d'une enceinte refroidie (Fig. 5) contenant de l'eau maintenue à 4 à 5°C, dont le fond est en plexiglas transparent pour permettre l'éclairement. Au-dessus de cette enceinte se trouve un agitateur-vibreur sur lequel on fixe une fiole d'Erlenmeyer qui renfermera le milieu de réaction. Le faisceau de lumière blanche est fourni par une lampe SYLVANIA Quartz-IODE DHY 118 V 650 W enfermée dans un chassis ventillé. Le faisceau rendu parallèle par une lentille mobile , traverse un filtre à I.R. constitué par un flacon plat, contenant de l'eau, arrive sur une deuxième lentille qui le focalise sur un miroir placé à 45° du fond en plexiglas. La lumière sera ainsi renvoyée perpendiculairement à la face inférieure de l'enceinte refroidie. Sur le trajet du faisceau lumineux, entre la lentille focalisatrice et le miroir, on a fixé un diaphragme obturateur commandé manuellement. La densité de flux lumineux arrivant au niveau des chloroplastes est de 30 000 lux, ce qui représente une énergie de 5 mW, cm^{-2} (calculée à partir de $\lambda = 556$ nm).

Composition du milieu I

Chloroplastes (ou grana) en suspension dans le saccarose 0,4M contenant 1000 µg de chlorophylle.

$MgCl_2$: 10 µM
Pyocyanine : 5.10^{-2}µM (E_o= -0,07 V)
Tampon succinate : pH 4,6 ou pH 6 : 5 µM
H_2O q.s.p. 1 ml

Composition du milieu II

ADP pH 8, : 5 µM
Phosphate monopotassique - phosphate disodique pH 8 : 5µM-200µ
Solution de $^{32}PO_4$ (contenant 1,6µM ^{31}P/mCi ^{32}P): 10 µCi-200 µCi
Tris (hydroxyméthyl aminométhane)-HCl : 70 µM (mélange de solutions à pH 8 et pH 8,4 afin d'amener le mélange des milieux I et II à un pH final de 8).
H_2O q.s.p. 0,5 ml.

Fig. 5

Dispositif servant à effectuer les photophosphorylations en deux temps.

r : fiole de réaction.

e : enceinte refroidie.

a : agitateur vibreur.

ch : chassis renfermant la lampe Sylvania.

l : lentille mobile.

f : filtre à I.R.

d : diaphragme obturateur.

Protocole expérimental

La réaction se déroule en deux temps. Dans un premier temps les chloroplastes sont éclairés dans le milieu I à bas pH ($4 \leq pH \leq 6$) pendant des temps variables. Ils sont placés dans une fiole conique de 25 ml et agités. La fiole est éclairée en lumière blanche par sa face inférieure, le reste est enveloppé de papier d'aluminium pour éviter un éclairement parasite ultérieur par la lumière ambiante. Après le temps déterminé, on obture le diaphragme et simultanément on injecte dans la fiole, à l'aide d'une seringue, le milieu II. On agite pendant 30 secondes la suspension à l'obscurité puis on injecte 0,2 ml de HCl 1 M. Cette suspension de chloroplastes est soumise à une électrophorèse sur papier haute tension (v. page 33) pour séparer l'ATP formé du phosphate minéral restant. Les emplacements de l'ATP, de l'orthophosphate et du pyrophosphate, radioactifs sont déterminés par autoradiographie (v. p.34). Les quantités de chaque composé phosphorylé séparé par électrophorèse, sont déterminées par comptage direct sur papier de leur radioactivité, au moyen d'un compteur de Geiger-Muller.

La quantité de X_e formé est exprimée par le nombre de molécules d'ATP formé à l'obscurité à pH 8.

D) PHOSPHORYLATION PAR VARIATION DE pH, SE DEROULANT A L'OBSCURITE (formation de X'_e).

Protocole expérimental

La réaction se déroule de façon semblable à celle décrite au paragraphe C.
L'appareillage est le même.
Les milieux I et II sont les mêmes mais le médiateur électrochimique - ici la pyocyanine, n'est pas nécessaire à cette réaction.
La différence réside dans l'absence totale d'éclairement.
La suspension de chloroplastes est agitée à l'obscurité dans une fiole de 25 ml et dans le milieu I pendant le temps déterminé (30 s à 10 mn). A la fin de ce temps on injecte le milieu II à l'aide d'une

seringue. On agite la suspension pendant 30 secondes à l'obscurité puis injecte 0,2 ml de HCl 1 M, pour arrêter la réaction. Cette suspension de chloroplastes sera soumise à une électrophorèse sur papier, haute tension. L'$AT^{32}P$ et le ^{32}Pi sont détectés sur le papier après autoradiographie (v.pg.34). La quantité de X'_e formé est exprimée par la nombre de molécules d'ATP formé. (Un témoin vérifiant qu'il n'y a pas formation d'ATP par phosphorylation oxydative, est fait en maintenant les chloroplastes dans le seul milieu II à l'obscurité).

E) TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

Appareil utilisé : Phérograph L. HORMUTH. Inh. W.E. Vetter.
Papier : Whatman 3 MM
Tampon pH 4,5 de composition :

pyridine	7,5 ml
acide acétique	12,5 ml
versène	65 mg
H_2O q.s.p.	1 litre

Tension utilisée : 2 000 V (champ électrique : 60 V/cm).
Température : 0°C
Temps de migration : 1 h

On imbibe la feuille de papier avec le tampon, puis on essore avec soin. On applique la feuille essorée sur la surface de verre refroidie et on dépose 40 µl de la suspension de chloroplastes à analyser du côté du pôle négatif. Une tension de 2000 V est appliquée pendant 1 h. Pendant ce temps, les ions phosphate inorganiques se sont séparés des phosphates organiques chargés, en particulier de l'adénosine diphosphate et de l'adénosine triphosphate.

Dans le cas où la suspension de chloroplastes contient des quantités importantes d'ions orthophosphates (50 à 200 µM) on soumet la suspension de chloroplastes à une électrophorèse sur papier, à deux dimensions, dans le même tampon. Pour la première dimension, la tension de 2000 V est appliquée pendant 1 h. Puis la feuille de papier, non séchée, est retournée de 90° et appliquée sur la plaque de verre du phérographe. La tension de 2000 V est appliquée pendant 20 minutes, pour la 2ème dimension.

L'électrophorèse faite dans la deuxième dimension permet de séparer les composés tels que l'AT^{32}P et l'orthophosphate (^{32}P), de la "trainée radioactive", qui est superposée à ces taches, lorsqu'on ne fait l'électrophorèse qu'à une seule dimension (voir Figure 5 : autoradiographie d'une électrophorèse sur papier à deux dimensions).

F) AUTORADIOGRAPHIE

Le papier est séché à 40°C, soumis à une autoradiographie par application d'un film Kodak, Kodirex 30 x 40 cm. 12 heures plus tard, on développe le film au moyen du révélateur Kodak Radio L x 24 et du fixateur Kodak AL 4. Il sera impressionné aux endroits où ont migré les différents composés contenant le phosphore radioactif. Par superposition du film au papier, les composés phosphorylés sont localisés sur le papier à électrophorèse. On découpe ces différentes taches et on procède directement sur le papier à une détermination de la radioactivité de chaque composé au moyen d'un compteur de Geiger-Muller.

G) TECHNIQUE DE DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE

Le rayonnement β du phosphore 32 est détecté au moyen d'un compteur de Geiger-Muller. L'ensemble de détection est constitué de trois parties ; le compteur lui-même qui est un tube muni d'une fenêtre mince en mica, et rempli d'un gaz ionisable (argon ou krypton). Dans l'axe du tube cylindrique se trouve une électrode que l'on porte à un potentiel défini, grâce à une source de haute tension stabilisée. La paroi du tube constitue la deuxième électrode et est reliée à la masse. Le tube compteur est relié par ailleurs à une échelle de comptage permettant de dénombrer les ions se déchargeant sur l'électrode centrale du tube. Ces ions prennent naissance à l'intérieur du tube lorsqu'il est traversé par les électrons émis à la suite des désintégrations radioactives.

La source radioactive est disposée sur une coupelle à une distance fixe de la fenêtre en mica du compteur. Le nombre d'impulsion enregistrées est proportionnel au nombre d'atomes radioactifs présents

Fig. 6 .

Autoradiographie d'une éléctrophorèse à deux dimentions d'une suspension de chloroplastes, ayant été le siège d'une photophosphorylation.

I. EVALUATION QUANTITATIVE DES COMPOSES PHOSPHORYLES

Elle se fait par comptage des impulsions émises par chacune des taches radioactives. La somme de toutes les impulsions donne la radioactivité totale de l'échantillon. Connaissant la quantité de phosphate ajoutée pendant l'expérience, et supposant que la quantité présente initialement dans les chloroplastes est négligeable vis à vis de l'orthophosphate ajouté, on évalue la quantité de chaque composé phosphorylé présent dans l'échantillon soumis à l'électrophorèse.

H) MESURE DU ΔpH

Les mesures de la variation de pH, ou de la quantité de protons fixés par une suspension de chloroplastes à la suite d'un éclairement, se font dans une cellule en verre de 35 mm de diamètre et 45 mm de hauteur. La cellule est à double parois pour permettre un refroidissement constant. De l'eau à 4° y circule. Dans cette cellule plongent : une électrode de verre et une électrode au calomel, reliées au pHmètre du type Tacussel (voir p.40 : appareillage). Lorsqu'on mesure la quantité de protons fixés entre les électrodes citées ci-dessus, deux tubes capillaires arrivent dans la cellule, l'un relié au réservoir d'acide HCl 10^{-2}M, l'autre relié au réservoir de soude : NaOH 10^{-2}M. Ces deux tubes sont reliés à l'ensemble de titrage automatique : Autotitristop (voir p.40 appareillage).

3 ml de suspension de chloroplastes sont agités dans la cellule par un agitateur magnétique.

La composition du milieu dans lequel on mesure les variations de pH de la suspension de chloroplastes est la suivante :

Chloroplastes en suspension dans le saccharose 0,4 M contenant 1,5 mg de chlorophylle.
$MgCl_2$: 30 µM
Pyocyanine : 15.10^{-2}µM
NaOH 10^{-2}M ou HCl 10^{-2} M q.s.p. pH 6.
H_2O q.s.p. 3 ml.

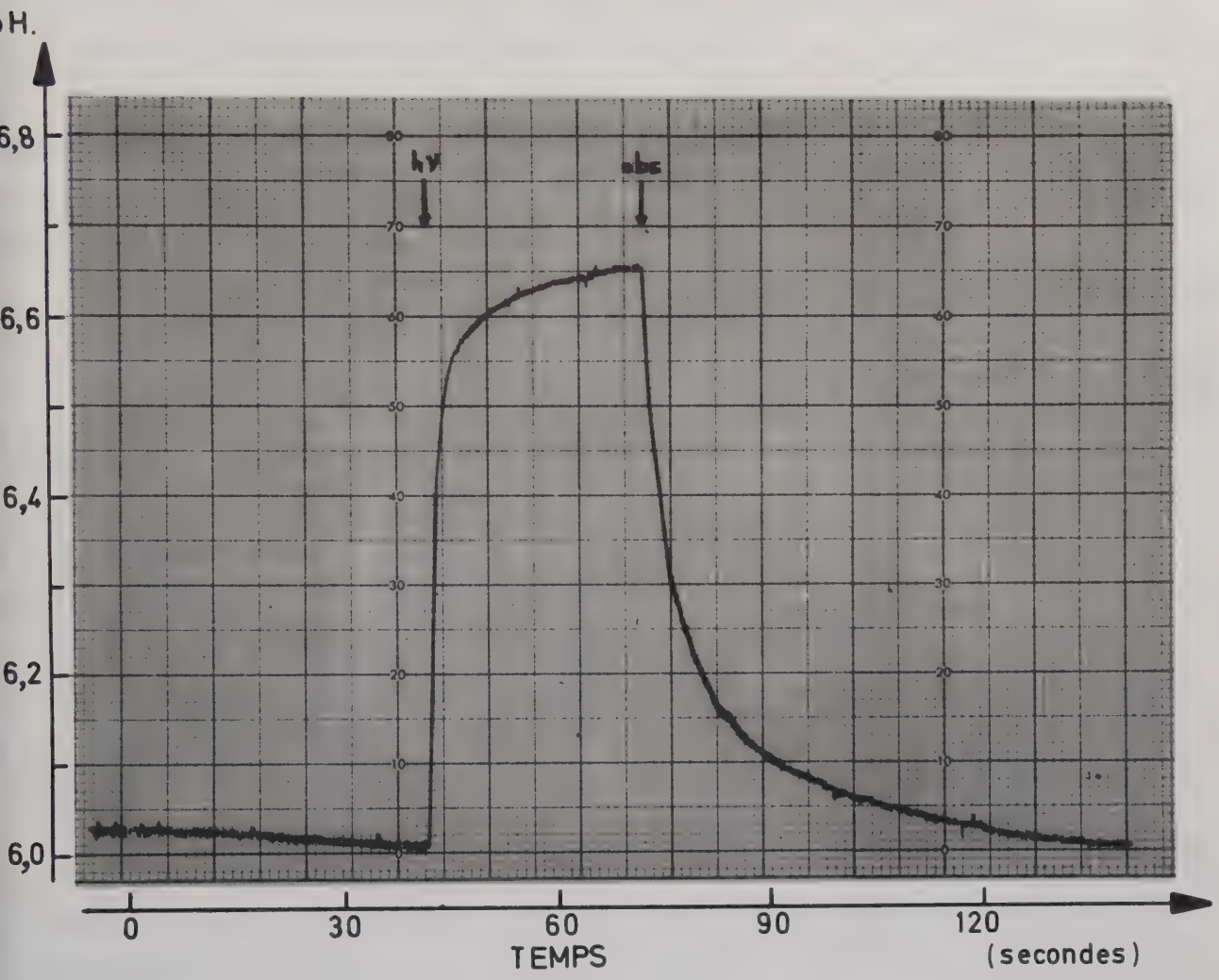


Fig. 7 .

Enrégistrement de la variation de pH d'une suspension de chloroplastes éclairée d'abord, puis remise à l'obscurité.

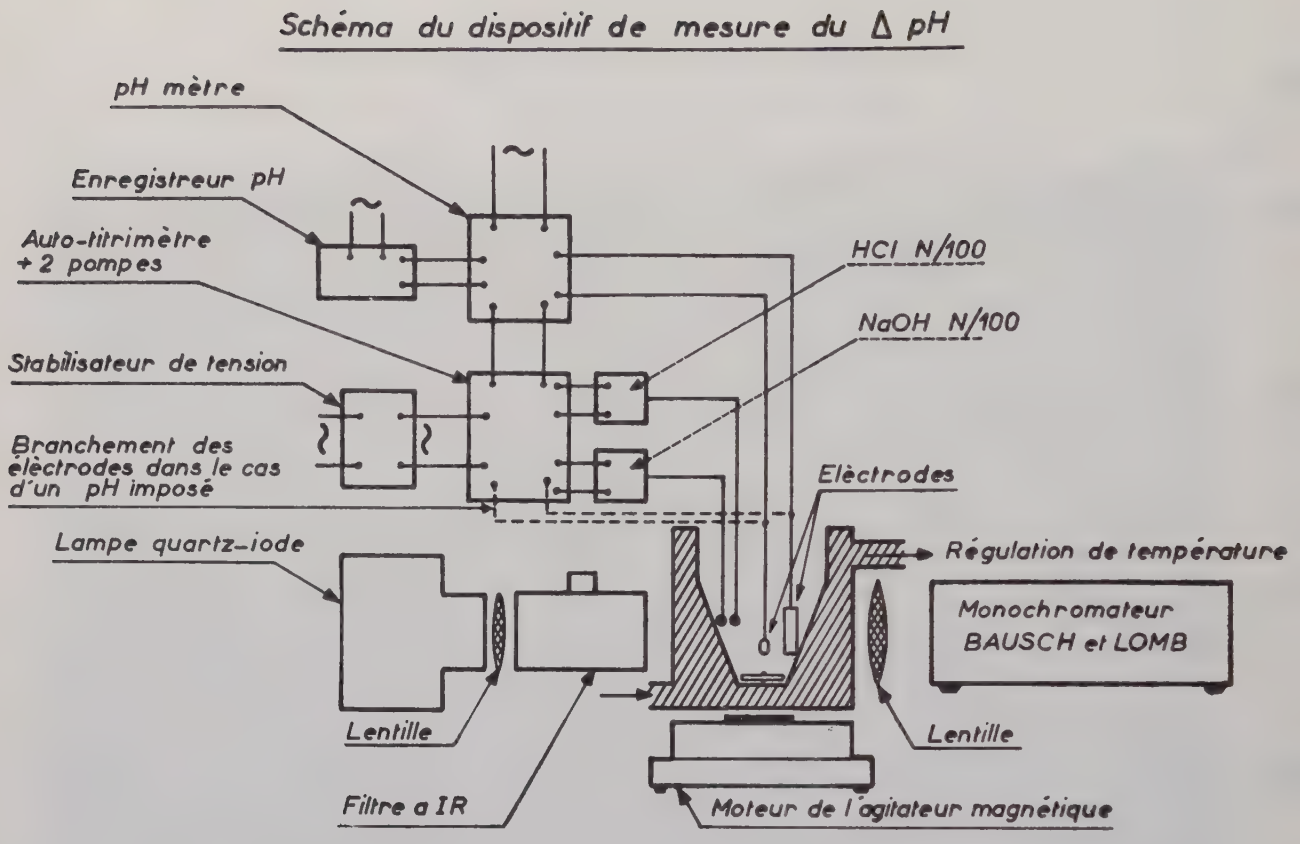


Schéma du dispositif de mesure du Δ pH
pH mètre
Enregistreur pH
Auto-titrimètre
+ 2 pompes
Stabilisateur de tension
Branchement des
électrodes dans le cas
d'un pH imposé
HCl N/100
NaOH N/100
Elèctrodes
Régulation de température
Monochromateur
BAUSCH et LOMB
Lampe quartz-iode
Lentille
Filtre a IR
Lentille
Moteur de l'agitateur magnétique

Fig. 8 .

La quantité de protons fixés par les chloroplastes à la suite d'un éclairement peut être évaluée par deux méthodes.

La première consiste à enregistrer directement les variations de pH pendant l'éclairement à l'aide d'un pHmètre enregistreur (cf. courbe d'enregistrement Fig. 7).

Le pouvoir tampon des chloroplastes est important et un calcul direct de la quantité de protons fixés par eux, à partir d'une mesure de variation de pH est impossible. Nous procédons donc à une mesure indirecte.

Nous éclairons la suspension de chloroplastes étudiée et enregistrons la variation de pH. Lorsque le pH a pris une valeur stable, on éteint la lumière et attend que le pH revienne à sa valeur initiale. Puis, toujours à l'obscurité, on ajoute à cette même suspension une quantité déterminée de soude : 0,2 µM NaOH/20 µl H_2O. La variation de pH consécutive à l'addition de la soude est enregistrée. Elle est proportionnelle à la quantité de soude ajoutée. Ainsi par une règle de trois on calculera la quantité de protons fixée par les chloroplastes (mais repérée par l'alcalinisation de cette suspension) ; en effet connaissant la variation de pH due à l'addition de la quantité connue de soude, et celle due à l'éclairement, nous obtenons immédiatement la quantité de protons fixés par la suspension de chloroplastes.

La deuxième méthode consiste à maintenir le pH de la suspension de chloroplastes constant, au moyen d'un titrimètre automatique à deux canaux. L'un contient l'acide : HCl 10^{-2}M, l'autre la base : NaOH 10^{-2}M. Chaque canal est muni d'un compte-tour sur lequel on lit en ml, la quantité d'acide ou de base, délivrée, qui a été nécessaire à maintenir constant le pH que l'on s'est fixé. Ainsi pendant l'éclairement, lorsque le pH de la suspension varie il est maintenu par addition de soude ou d'acide, dont on lira directement les quantités délivrées par les micropompes. De cette façon, on connait par lecture directe sur les compte-tours la quantité de protons fixée à la suite d'un éclairement, ou celle libérée pendant la période obscure qui suit l'éclairement.

Cette deuxième méthode est utilisée lorsqu'on veut connaître la quantité globale de protons fixés ou libérés, alors que la première méthode est utilisée pour les études cinétiques de fixation ou libération des protons.

Appareillage

Dans le cas d'un enregistrement direct du pH on emploie le pHmètre titrimètre type TS7, Tacussel et l'enregistreur Beckman Linear n°100 504.

Dans celui où l'on impose un pH constant on emploie l'ensemble de titrage automatique "Autotitristop 2" de Tacussel. (Cf. schéma Fig. 8). Cet ensemble comprend :

1) un pHmètre (amplificateur à grande impédance d'entrée) TS7 (le même que ci-dessus).
2) une unité de régulation et de contrôle "l'URECTRON 4"
3) deux micropompes à galets munies de compte-tours type CTE pour la mesure des volumes de réactifs délivrés.

Les électrodes employées sont :

l'électrode de verre Radiometer type G 2222 C,
l'électrode au calomel Radiometer type K 4112.

L'éclairement de la cellule de réaction en lumière blanche se fait au moyen d'une lampe Sylvania quartz-iode DWY 118 V 650 W (la même que celle décrite p.30). La densité de flux énergétique arrivant au niveau des chloroplastes, calculée à partir des mesures faites avec un luxmètre Metrix, est de 250 mW cm^{-2}. Elle est 50 fois supérieure à celle arrivant au niveau des chloroplastes dans l'appareil servant aux photophosphorylations en deux temps. En effet, les distances séparant les sources lumineuses des chloroplastes dans les deux appareils sont respectivement 28 cm et 4 cm, c'est à dire sont dans un rapport de 7, et l'on sait que la densité de flux énergétique est inversement proportionnelle au carré de la distance séparant la source du point considéré. Cependant le rapport des densités de flux reçues par les chloroplastes n'est que de 3 environ, puisque l'épaisseur de la suspension de chloroplastes est de 1,6 cm dans le cas de la Figure 9 : mesures de $\triangle$pH , et de 0,1 cm dans le cas de la figure 5 : mesures de photophosphorylation en deux temps.

L'éclairement de la cellule de réaction, en lumière monochromatique se fait au moyen d'un monochromateur Baush et Lomb. La densité de flux énergétique est alors mesurée au moyen d'une thermopile.

Technique de mesures simultanées de $\triangle$pH et de photophosphorylation en deux temps.

Les réactions de photophosphorylation en deux temps sont réalisées simultanément avec les mesures de $\triangle$pH de la façon suivante : la cellule de mesure contenant 3 ml de suspension de chloroplastes est éclairée au temps 0. La variation de pH est enregistrée. Après un temps d'éclairement fixé, on prélève dans la cuve, au moyen d'une seringue automatique, obscurcie au préalable et contenant 0,5 ml de milieu II à pH 8 (cf. schéma Fig.9) 1 ml de suspension de chloroplastes. Les deux milieux immédiatement mélangés dans la seringue, sont injectés 30 secondes après le prélèvement dans une fiole contenant 0,2 ml HCl 1 M.

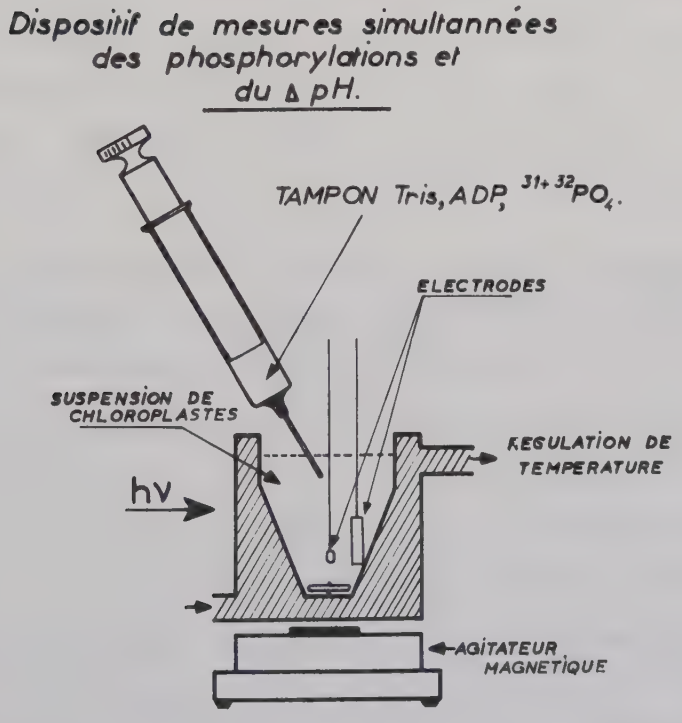


Fig. 9 .

CRITIQUE DES METHODES

1°) La méthode d'évaluation de X_e par les quantités d'ATP formé est sujette à deux critiques :

a) la durée de vie de X_e est courte. En conséquence X_e est détruit pendant la phase d'éclairement aussi bien que pendant la phase d'obscurité. Nous mesurons donc après le temps optimal d'éclairement une quantité stationnaire de X_e pendant laquelle il s'en forme autant qu'il s'en détruit ;

b) nos techniques de mélange des milieux I et II ne sont pas assez rapides, pour que la décroissance de X_e n'intervienne pas entre la fin de l'éclairement et le mélange complet des milieux I et II.

Ces deux critiques ne s'appliquent pas aux mesures de X'_e, car il n'est pas possible d'évaluer une durée de vie de celui-ci. Nous venons de voir qu'à pH acide il se forme, après 2 minutes de séjour des chloroplastes dans le milieu acide, une quantité constante de X'_e (pendant 10 minutes au moins) révèlable seulement par variation de pH. X'_e est peut être seulement formé pendant la variation de pH ; et les deux minutes de séjour des chloroplastes, nécessaires pour obtenir la quantité maximum de X'_e, peuvent ne révèler que le temps nécessaire aux protons pour pénétrer à l'intérieur du granum.

2°) La mesure de l'ATP synthétisé, par la technique de mesure de l'$AT^{32}P$ formé est une mesure indirecte. En effet un dosage direct de la quantité d'ATP synthétisé serait plus exact.

Cependant nos mesures sont des évaluations relatives et non absolues.

Nous avons aussi choisi cette technique pour sa rapidité par rapport à celle d'un dosage quantitatif de l'ATP.

3°)La détermination des quantités d'ATP synthétisé se fait à partir des quantités connues d'orthophosphate ajouté à la suspension de chloroplastes. En effet, connaissant l'activité spécifique de l'orthophosphate ajouté et la radioactivité de l'ATP synthétisé, par une règle de trois nous calculons la quantité d'ATP synthétisé.

Dans ce calcul nous ne tenons pas compte des quantités d'orthophosphate contenues dans les chloroplastes. Celles-ci peuvent varier de 0,2 à 0,8 µM par milligramme de chlorophylle. Les quantités que nous ajoutons varient de 5 à 200 µM d'orthophosphate par milligramme de chlorophylle (sauf dans un cas où nous avons ajouté 2 µM). La quantité d'ATP évaluée l'est donc peut être par excès ; mais encore une fois, ici chacune des expériences est faite avec la même préparation de chloroplastes et les quantités d'ATP, calculées sont comparables. Les seules courbes qui pourraient être entachées d'erreurs sont celles où la quantité d'ATP est mesurée en fonction de la concentration en ions orthophosphate ; mais cela seulement pour les concentrations les plus faibles en orthophosphate (5 et 10 µM). Pour les autres concentrations l'erreur est négligeable.

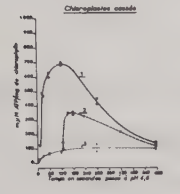
RESULTATS RELATIFS A X_e, X'_e et X~P.

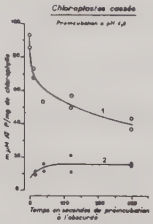
A. Chaleur minimale de formation de X_e et X'_e = 15,6 Kcal.(calculée)

B. Influence de la préincubation des chloroplastes dans un milieu à bas pH.

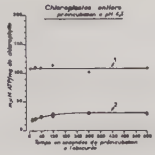
ATP = f(temps passé à pH 4,6)

chloroplastes cassés





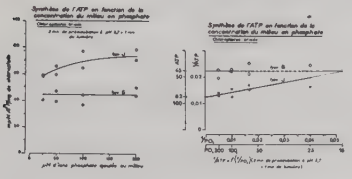
chloroplastes entiers



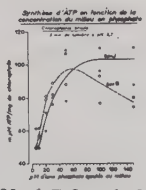
C. Influence de la concentration en ions orthophosphate présents soit pendant l'éclairement (type B) soit à l'obscurité (type J).

a) faibles concentrations ⟶ $(ATP)_B - [(ATP)_A + (ATP)_C] = X\sim P$

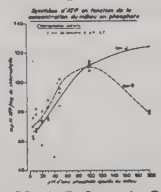
b) fortes concentrations ⟶ inhibition des photophosphorylations



$25\mu M < PO_4 < 200\mu M$



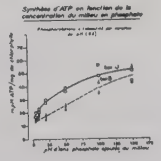
$5\mu M < PO_4 < 150\mu M$



$5\mu M < PO_4 < 200\mu M$

D. Influence de la concentration en ions orthophosphate sur les phosphorylations obtenues à l'obscurité par variation de pH.

$ATP = f[PO_4]$



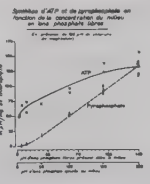
⟶ pas d'inhibition

E. Influence de la concentration en ions Mg^{++} sur la synthèse d'ATP :

Type B : $Mg^{++} \nearrow \longrightarrow ATP \nearrow$; Type J : $Mg^{++} \nearrow \longrightarrow ATP \searrow$

Lorsque Mg^{++} est 10 fois supérieur aux expériences du §C :

$ATP_B = f[PO_4]$



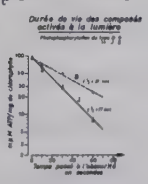
⟶ levée de l'inhibition par les conc.élevées en PO_4.

F. Demi-vie des composés activés à la lumière en présence (X~P) et en absence (X_e) d'ions orthophosphate.

Types B et J

Mg^{++} = 100µM

PO_4 = 100µM

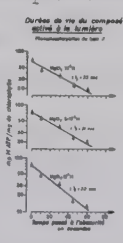


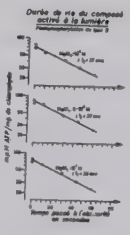
$t_{1/2B}$ =31s

$t_{1/2J}$ =17s

Mg^{++} =	Type J	Type B
10µM	$t_{1/2}$=38s	$t_{1/2}$=37s
50µM	=31s	=37s
100µM	=22s	=36s

PO_4 = 100µM





Conclusion : Il existe trois formes activées du chloroplaste: X_e, X'_e et X~P

IV. EXPOSE DES RESULTATS OBTENUS RELATIVEMENT A :

- L'étude comparative de quelques propriétés caractéristiques de X_e et de X'_e .
- La formation d'un composé phosphorylé riche en énergie.

Introduction.

En 1962 Shen et Shen (33) et en 1963 Jagendorf (34), montraient (voir historique pg.15) que la réaction de photophosphorylation se déroulant dans le chloroplaste, ou plus précisément dans le granum, se divisait en deux étapes. L'une nécéssitant la lumière, l'autre pouvant se dérouler à l'obscurité. Les chloroplastes devaient etre éclairés dans un premier temps en présence d'un médiateur électrochimique : la pyocyanine, pour etre capable de synthétiser l'ATP lorsque on les remettait à l'obscurité en présence d'ADP et d'orthophosphate et d'un tampon amenant la suspension à pH 8. Ces auteurs concluaient donc à la formation dans le granum pendant la période lumineuse d'un intermédiaire non phosphorylé, " riche en énergie ", capable à l'obscurité de synthétiser l'ATP. En effet des témoins placés à l'obscurité pendant les deux phases ne présentaient pas de synthèse d'ATP mesurable.

Cet intermédiaire, que Jagendorf a appelé X_e , est donc formé soit à la suite , soit au cours du déplacement des électrons dans la chaine de transfert d'électrons située dans le granum. Dans tous les cas, sa formation est stimulée par l'addition de médiateurs électrochimiques, facilitant le transfert des électrons.

Les expériences faites simultanément en 1965 par Jagendorf (35) (voir historique pg.18) et par nous-mêmes (résultats non publiés) mettaient en évidence une synthèse de l'ATP sans éclairement préalable. Les chloroplastes ou grana étaient mis en suspension à l'obscurité dans un tampon à pH 4, puis après 60 secondes injectés, toujours à l'obscurité, dans une solution contenant l'ADP, l'orthophosphate et le tampon Tris à pH convenable pour obtenir le pH final égal à 8.

De cette façon Jagendorf et nous même observions une synthèse d'ATP. Avec une suspension de chloroplastes (ou grana) témoins dont le pH initial était de 7 et le pH final était 8, Jagendorf obtenait 2% d'ATP synthétisé par rapport à la quantité synthétisé lorsque le pH initial était de 4, .

Nous voulons insister sur le fait que dans les expériences où l'on obtient une synthèse d'ATP à l'obscurité, par seule variation de pH, il n'est pas nécessaire d'ajouter un médiateur électrochimique (tel que la pyocyanine), contrairement aux expériences se déroulant en deux étapes : l'une lumineuse, l'autre obscure.

Jagendorf appelle X_e' ce composé activé, qui par seule variation de pH est capable de synthétiser l'ATP.

Signalons encore, que les quantités d'ATP synthétisé à l'obscurité par seule variation de pH (X_e')sont très inférieures à celles obtenues lors de la réaction en deux étapes : où les chloroplastes (ou grana) sont éclairés dans un premier temps à pH 6 et en présence d'un médiateur électrochimique, suivi d'une phase obscure à pH 8 (X_e).

Ces expériences confirment donc que la synthèse d'ATP à partir d'ADP et d'orthophosphate est une réaction se déroulant à l'obscurité.

Par contre la formation de X_e est très certainement couplée à un transfert de charge induit par la lumière et facilitée par la présence du médiateur éléctrochimique.

Nous pensons que la formation de X_e' par variation de pH de la suspension de chloroplastes (ou grana) peut aussi etre couplée à une migration d'électrons.

On peut en effet supposer qu'a l'intérieur du granum existent au moins deux composés dont l'un possède un potentiel redox indépendant du pH, l'autre au contraire un potentiel redox qui en dépend. Une variation du pH du milieu entrainera dans un tel système une variation de son potentiel redox et en mème temps changera l'équilibre ox/red de chacun des deux composés. Ceci entraine par là même un déplacement de charges.

En effet considérons deux composés en équilibre A et B :

$$A_{ox} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}$$

où le <u>potentiel de A ne dépend pas du pH</u> alors que celui de <u>B en dépend</u>.

L'équation générale donnant le potentiel redox est :

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \text{Ln} \frac{ox}{red} \quad \text{ou en simplifiant} \quad E = E_o + \frac{0,06}{n} \log \frac{ox}{red}$$

Lorsque le potentiel E dépend du pH, l'équation devient :

$$E = E_o + \frac{0,06}{n} \log \frac{ox}{red} - 0,06\ pH$$ (en supposant qu'il y a autant de protons que d'électrons mis en jeu).

La Fig.10 représente les courbes de variation du potentiel redox en fonction du rapport ox/red pour les deux composés hypothétiques A et B.

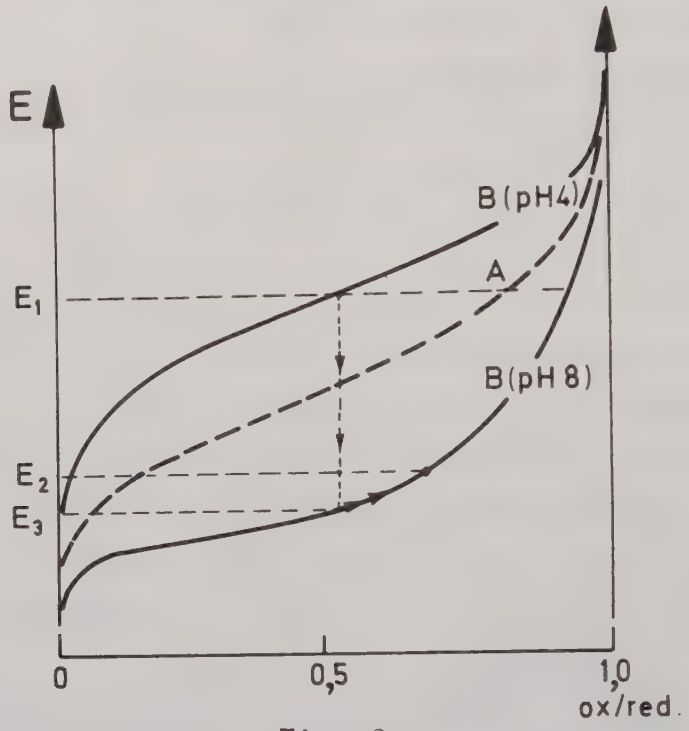


Fig. 10.

A pH 4, le système en équilibre est au potentiel E_1. Faisons maintenant varier brusquement le pH jusqu'à la valeur de 8. Le potentiel de B baissera à une valeur $E_2 \simeq E_1 - 0{,}24$ V pendant un temps court où le rapport ox/red de B ne varie pas. A étant au potentiel E_1 oxydera B, et le potentiel final d'équilibre passera à E_3. Par le passage du système de pH 4 à pH 8, B aura été oxydé et A réduit. Il y aura eu mouvement d'électrons dans le système.

Ainsi la formation de X_e et celle de X_e' doivent etre couplés à un transfert de charges se déroulant dans le granum, l'un provaqué par la lumière l'autre par la variation de pH. Mais dans les deux cas la formation de X_e et celle de X_e' précèdent l'activation de l'ion orthophosphate.

La nature de X_e et celle de X_e' nous est inconnue. Nous ne connaissons pas leur énergie d'activation.

Par ailleur la formation d'un intermédiaire phosphorylé " riche en énergie " $X \sim P$, ne nous semble pas impossible.

C'est pourquoi dans ce chapitre nous avons :

A. calculé la chaleur minimale de formation de X_e et de X'_e ,

B. comparé avec des chloroplastes entiers ou des grana les cinétiques de formation de X_e et de X'_e dans un milieu acide, (pH 4,6).

C.et D. Comparé l'influence de la variation de concentration des ions orthophosphate sur la formation de X_e et de X'_e lorsqu'ils sont présents dans le milieu à bas pH (contenant pyocyanine, $MgCl_2$ et tampon succinate) pendant la phase lumineuse pour X_e et pendant la phase obscure pour X'_e. Et d'autre part lorsqu'ils sont présents seulement dans le milieu II à pH 8, pendant la phase obscure.

E. étudié l'influence de la concentration en ions magnésium sur la synthèse d'ATP et de pyrophosphate obtenue lorsque les ions orthophosphate se trouvaient présents dès la phase lumineuse (dans le milieu I), et lorsque ces mêmes ions orthophosphate ne se trouvaient présents que pendant la seule phase obscure. Parallèlement nous avons comparé l'action des ions magnésium sur l'apparition et la disparition du $\triangle$ pH.

F. comparé les demi-vies des composés activés à la lumière, en présence ($X\sim P$) et en absence (X_e) d'ions orthophosphate, et en fonction de la concentration en ions magnésium.

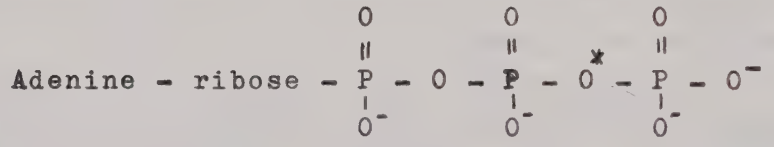
G. émis des hypothèses concernant le mécanisme de formation de X_e et de $X\sim P$ et d'autre part le rôle joué par les ions magnésium.

Résultats.

A. CHALEUR MINIMALE DE FORMATION DE X_e OU DE X'_e.

Les composés (hypothétiques) activés à la lumière pour X_e et à l'obscurité pour X'_e sont capables de transmettre leur énergie à un ion orthophosphate qui en présence d'ADP va former de l'ATP.

Nous allons évaluer leur énergie transmise à l'ion orthophosphate. L'ion orthophosphate va se transformer en ion (ou radical) métaphosphate monomère suivant : $HPO_4^{=} \longrightarrow PO_3^{-} + OH^{-}$. C'est la forme la plus probable sous laquelle le phosphate réagit car d'après les études de M. Cohn (29) et M. Avron (30) faites à l'aide de l'oxygène 18, l'oxygène reliant les deux groupements phosphate dans l'ATP (O^*) provient de l'ADP et non du phosphate réagissant. Celui-ci perd donc un groupement OH avant de se fixer sur l'ADP pendant son activatio



On ne peut évaluer l'énergie du composé activé que par défaut, puisque elle doit être nécéssairement supérieure à l'énergie requise pour enlever un groupement OH à la molécule d'orthophosphate. D'après les données de Van Wazer (47) les chaleurs de formation sont :

$$\Delta H \quad PO_4H_3 \text{ aq} = - 308,2 \text{ kcal}$$

$$\Delta H \quad PO_3H \text{ aq} = - 234,8 \text{ kcal}$$

$$\Delta H \quad H_2O \qquad = - 57,8 \text{ kcal}$$

d'où la chaleur de réaction (endothermique dans le sens $\longrightarrow$)

$$PO_4H_3 \text{ aq} \rightleftharpoons PO_3H \text{ aq} + H_2O + \Delta H_R$$

$$\Delta H_R = - 234,8 - 57,8 + 308,2$$

$$= 15,6 \text{ kcal.}$$

C'est l'énergie nécéssaire pour faire se séparer un groupement H du reste de la molécule de l'orthophosphate. Donc le composé ctivé (X_e ou X'_e) doit fournir par désactivation une énergie au moins gale à 15,6 kcal.

. INFLUENCE DE LA PREINCUBATION DES CHLOROPLASTES DANS UN MILIEU A BAS pH (pH 4,6). COMPARAISON ENTRE X_e et X'_e .

En 1966 Jagendorf et Uribe (35) font incuber des chloroplastes ans un milieu de pH 4,5 à l'obscurité pendant des temps variants e 15" à 600". Ils étudient l'influence du temps d'incubation sur la uantité d'ATP prenant naissance à l'obscurité à la suite de l'augmen- ation brusque de pH 4,5 à 8 de la suspension, (X'_e), cette dernière emeurant à l'obscurité pendant toute la durée de l'expérience.

Ils constatent que l'augmentation du temps d'incubation n'entraine u'une faible diminution de la quantité d'ATP synthétisé à la suite e la seule variation de pH.

Nous avons repris ces premiers essais d'une façon systématique, en étudiant les cinétiques d'apparition et de disparition non seulement de X'_e mais aussi de X_e.

Les suspension de chloroplastes d'une part, de grana d'autre part sont soumises à des préincubations de durées variables comprises entre 10" et 600" dans le milieu I de pH 4,5. Ces préincubations ont lieu dans une première série d'expériences à la lumière, dans une seconde à l'obscurité.

Les graphiques 11, 12 et 13 rendent compte de l'évolution de X_e t de celle de X'_e en fonction de la durée de cette préincubation n milieu acide. X_e et X'_e formés après des temps de préincubation e 10", 30", 60", 120", 300" et 600" dans les conditions qui viennent 'être définies, sont révélés et mesurés par la synthèse d'ATP obtenue à l'obscurité à la suite de l'addition à la suspension du milieu II e Jagendorf qui contient l'orthophosphate et l'ADP et dont le pH est 8.

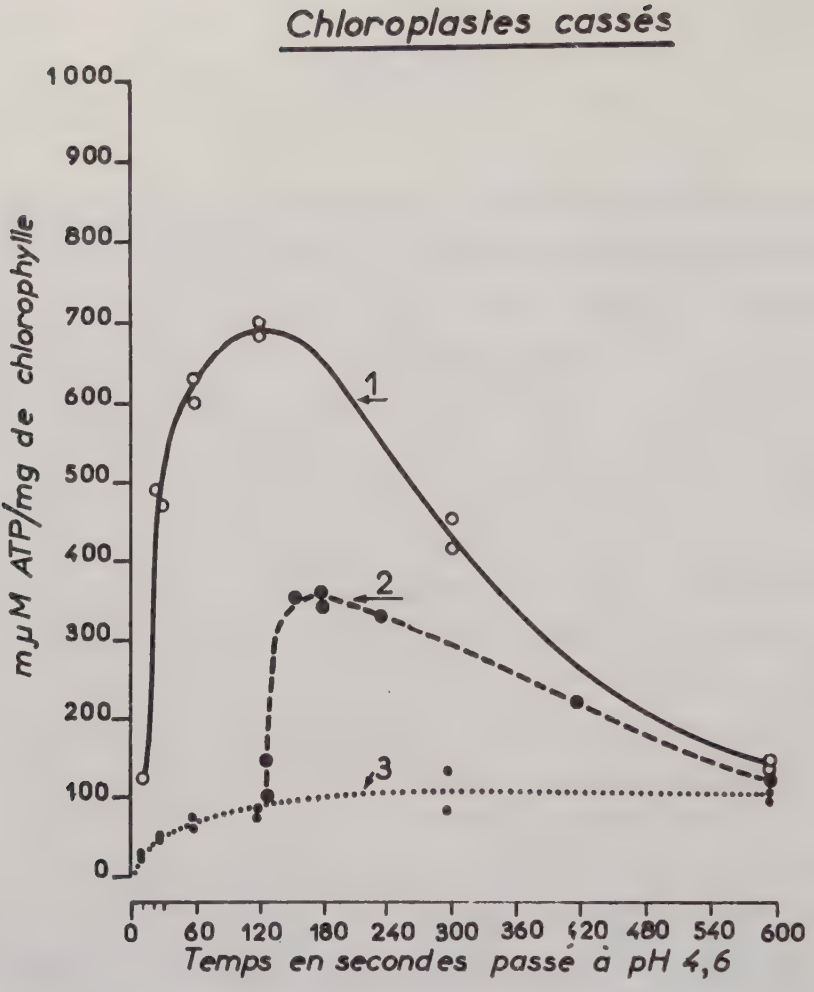


Fig. 11

Synthèse d'ATP en fonction du temps passé dans le milieu I, acide, en présence ou en absence de lumière.

1. Les grana sont éclairés pendant toute la durée du séjour dans le milieu I ($X_e + X'_e$).
2. Les grana restent 2 minutes à l'obscurité dans le milieu I, puis seulement sont éclairés pendant des temps variants de 10 sec. à 8 min. ($X_e + X'_e$).
3. Les grana restent à l'obscurité pendant toute la durée du séjour à pH 4,6.(X'_e).

Protocole expérimental de la Fig. 11.

1 ml. de suspension de chloroplastes contenant : 1 mg de chlorophylle, 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 10 µM de $MgCl_2$, 5 µM de tampon succinate à pH convenable pour amener la suspension à pH 4,6, est agité pendant des temps variant de 10 à 600 secondes à la lumière (courbe 1), à l'obscurité (courbe 3), et 2 min. à l'obscurité puis 10 à 300 secondes à la lulière (courbe 2). A la fin des temps indiqués ci-dessus, on ajoute à l'obscurité : 1 ml d'eau contenant : 5 µM d'orthophosphate, 5 µM d'ADP, 10 µCi ^{32}P, 70 µM de tampon Tris-HCl 1M;(milieu II), et on agite. Après 30 secondes on ajoute 0,2 ml HCl 1M. Les suspensions de chloroplastes sont maintenues à 5 C pendant toute la durée de l'expérience. Les pH des suspensions de chloroplastes dans le milieu I;puis dans les milieu I + II étaient vérifiés sur des suspensions témoins.

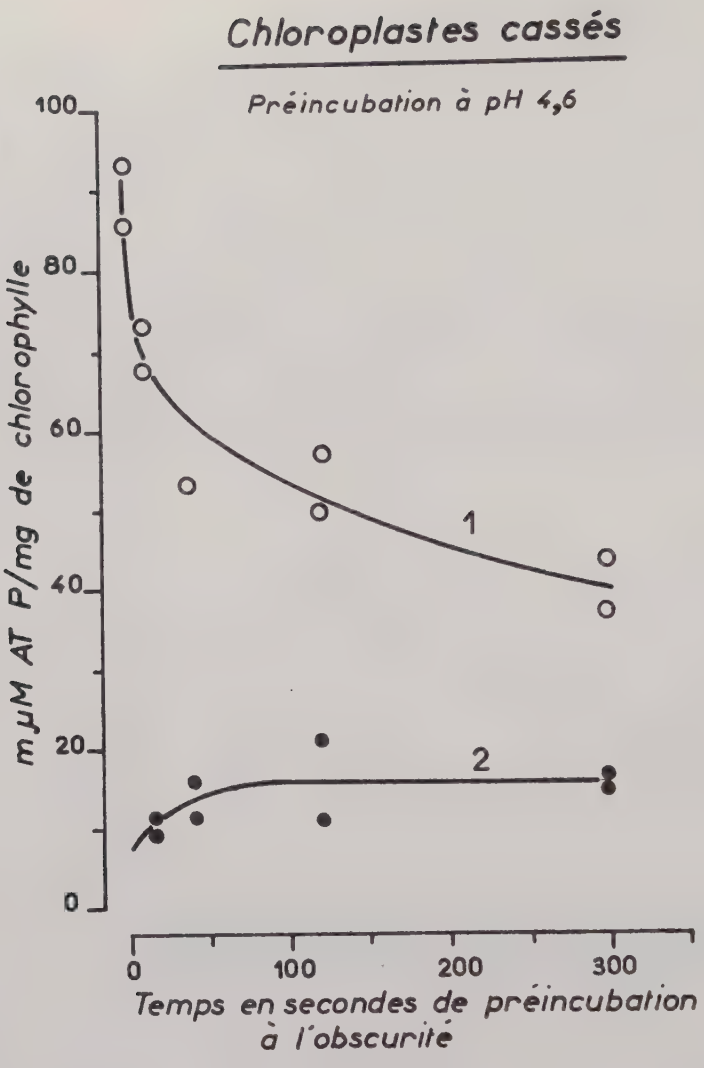


Fig. 12

Synthèse d'ATP : en fonction du temps passé à l'obscurité à pH 4,6, précédant 1 minute d'éclairement : courbe 1 ; en fonction du temps passé à l'obscurité (sans éclairement) : courbe 2.

Protocole expérimental :

Il est essentiellement le même que celui décrit avec la figure 10, à ceci près que les " grana " sont agités à l'obscurité dans le milieu I à pH 4,6 des temps variant de 10 à 300 secondes avant d'être éclairés pendant 1 minute, ou sans être éclairés, puis sont agités à l'obscurité en présence du milieu II comme cela est décrit avec la figure 11.
Les milieux I et II sont les mêmes que ceux décrits avec la figure 11

La courbe (2) montre aussi la destruction du site capable de donner à la lumière X_e, par le séjour des chloroplastes pendant 2 minutes à pH 4,6. Les trois courbes se rejoignent après 10 minutes de séjour à pH 4,6, ce qui veut dire que X'_e (à 5°C) n'est pas perturbé par la présence prolongée des protons, alors que X_e est détruit.

Cette constatation plaide en faveur de l'hypothèse que l'enzyme ou le site chloroplastique déterminant l'activation du phosphate n'est pas le même dans les deux cas : celui de la formation de X_e et celui de la formation de X'_e.

La courbe 1 (Fig. 12) représente la décroissance du pouvoir phosphorylant (X_e) apparaissant à la lumière à la suite d'une action prolongée du tampon acide. La courbe 2, (analogue de la courbe 3 de la Fig. 11) représente la formation de (X'_e), après des durées de contact avec le tampon acide variant de 15 secondes à 5 minutes.

Les résultats représentés sur la Fig. 12 confirment ceux de la Fig.11, à savoir que le passage prolongé des chloroplastes dans un milieu acide, inhibe chez ces chloroplastes le pouvoir d'activer le site X_e, ou plus simplement détruit ce site. En effet : que l'action prolongée du tampon acide se fasse à la lumière ou à l'obscurité, le résultat final est le même. Il y a une diminution notable de la capacité à synthétiser l'ATP : X_e diminue de moitié environ après un séjour de 5 minutes dans le tampon à pH 4,5, et après 10 minutes il ne subsiste plus que la capacité à synthétiser l'ATP par simple variation de pH (X'_e).

Les courbes 3 de la Fig. 11 et 2 de la Fig. 12, représentent l'accroissement de la synthèse d'ATP (où de l'apparition du site X'_e) en fonction du temps passé par les chloroplastes cassés (ou grana) dans le tampon acide. Ces deux courbes sont parallèles.

Ainsi l'action prolongée du tampon acide sur les chloroplastes cassés, ou grana, inhibe la formation de X_e et stimule celle de X'_e.

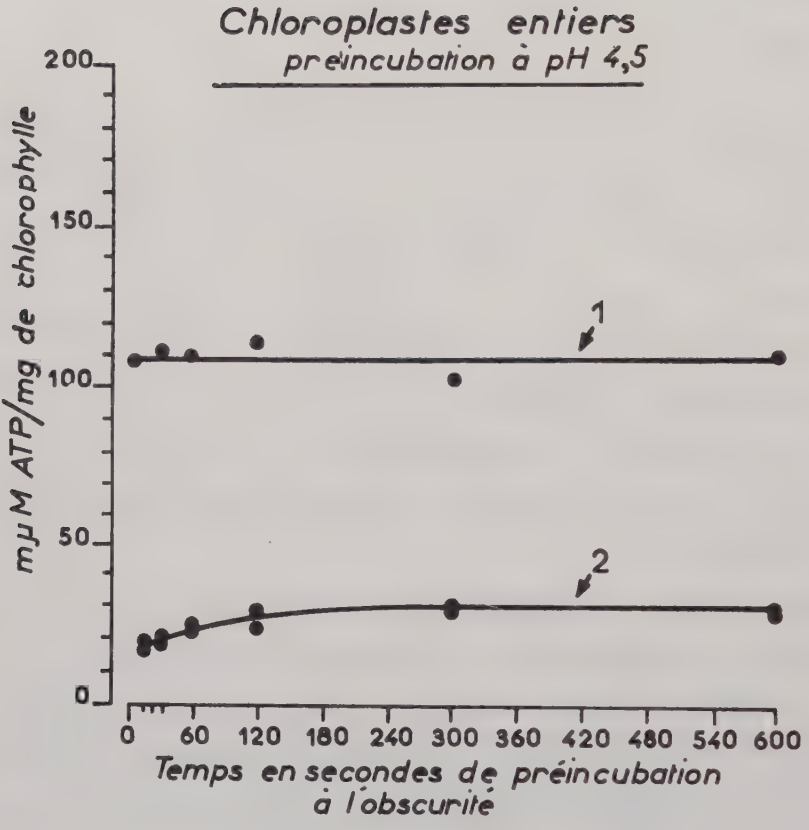


Fig. 13

LEGENDE DE LA FIGURE 13 -

Chloroplastes entiers. Synthèse d'ATP en fonction du temps passé par les chloroplastes à l'obscurité et dans le milieu acide : avant 1 minute d'éclairement : courbe 1 ; avant l'addition du milieu alcalin : courbe 2 .
Les milieux utilisés sont les mêmes que dans la Fig.11.
Le protocole expérimental est celui décrit avec la Fig. 12.

Au contraire, chez les chloroplastes "entiers", qui ont conservé une grande partie du stroma, la synthèse d'ATP qui suit un éclairement (X_e) n'est pas modifiée par une préincubation de 10 minutes dans le tampon acide : Fig.13 , courbe 1.

Mais la quantité d'ATP synthétisé par seule variation de pH (à partir de X'_e) augmente pendant les deux premières minutes de préincubation acide pour rester stationnaire après des temps plus longs (5 et 10 minutes). Les chloroplastes "entiers" et "cassés" ont donc le même comportement à l'égard de la formation de X'_e (cf. Fig. 11 courbe 3 et Fig. 13 courbe 2) mais un comportement différent à l'égard de la formation de X_e (cf. Fig.11 courbe 1 et Fig.12 courbe 1). On peut penser que chez les chloroplastes "entiers", les sites des grana, où se forme X_e, à la lumière, sont protégés du contact direct avec les protons du milieu extérieur. Au contraire, les sites où se forme X'_e, sont plus facilement accessibles à ces protons.

Ce résultat est en faveur d'une distinction entre les sites de formation de X_e et de X'_e.

C) INFLUENCE DE LA TENEUR DE LA SUSPENSION DE CHLOROPLASTES ("ENTIERS" OU "CASSES") EN IONS ORTHOPHOSPHATES SOIT PENDANT LA PHASE LUMINEUSE A BAS pH, SOIT PENDANT LA PHASE OBSCURE A pH 8, SUR LA SYNTHESE d'ATP, (X_e).

L'étude de l'influence de la présence des ions phosphates dans le milieu à bas pH a été entreprise pour permettre de répondre à la question de savoir s'il existe un précurseur phosphorylé ($X \sim P$) de la synthèse de l'ATP.

Selon HIND et JAGENDORF [34], la quantité d'ATP formé est la même, que l'orthophosphate soit ajouté pendant la phase lumineuse ou pendant la phase obscure.

Nos résultats sont différents :

1) Pour de faibles concentrations en orthophosphate les quantités d'ATP formé sont plus importantes lorsque les ions $H_2PO_4^-$ sont présents dès le début de la phase lumineuse.

2) Pour de fortes concentrations en orthophosphate les quantités d'ATP formées sont plus importantes lorsque l'orthophosphate n'est ajouté qu'au début de la phase obscure (c'est à dire n'est présent que dans le milieu à pH 8).

Nous dénommons les expériences qui suivent par les lettres A, B, C et J. Elles se différencient par le moment et le milieu auxquels les ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ et $H_2{}^{32}PO_4^-$ sont ajoutés.

Type A

Dans les expériences du type A, les ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ et $H_2{}^{32}PO_4^-$ sont présents dans le milieu I au début de la phase lumineuse et dès la fin de l'éclairement on ajoute une quantité d'HCl suffisante pour porter le milieu à pH 1 et arrêter les réactions. On obtient alors la quantité d'ATP formé à partir du seul ADP intrachloroplastique au pH du milieu I.

Type B

Dans les expériences du type B, les ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ et $H_2{}^{32}PO_4^-$ sont présents dans le milieu I. Le milieu II contient seulement : Tris et ADP (voir chapitre : Techniques et Méthodes, p.26). On mesure alors la quantité maximale d'ATP susceptible d'être formée à pH 8 par des chloroplastes ayant acquis à bas pH lors de l'éclairement une capacité d'activation des ions orthophosphates ($X_e + X'_e + X \sim P$)

Type C

Dans les expériences du type C, les ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ sont seuls présents dans le milieu I et les ions $H_2{}^{32}PO_4^-$ sont ajoutés dès le début de la phase obscure en même temps que le milieu II. La radioactivité retrouvée dans l'ATP formé dans ces conditions correspond à la révélation de $X_e + X'_e$.

Type J

Dans les expériences du type J, les ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ et $H_2{}^{32}PO_4^-$ ne sont présents que dans le milieu II. La quantité d'ATP formée mesure la capacité à activer les ions orthophosphates acquise par la suspension de chloroplastes au cours de la minute pendant laquelle la suspension a été éclairée en l'absence d'ions $H_2PO_4^-$, c'est à dire $X_e + X'_e$.

a) Expérience avec de faibles concentrations en phosphate

Nous avons comparé [48] les quantité d'ATP synthétisé dans les quatre types d'expériences et pour chacun de ces types d'expérience A, B, C et J nous avons réalisé trois séries de manipulations en partant de trois pH différents : 4,45, 6 et 7,3 pour le milieu I.

Les manipulations du type A donnent les quantités d'ATP synthétisé à la lumière à partir de l'ADP intrachloroplastique. Elles augmentent en même temps que le pH de la phase lumineuse lorsque celui-ci passe de 4,5 à 6 puis à 7,3.

Lorsque le pH de la suspension de chloroplastes lors de la phase lumineuse est 6 ou 7,3, les quantités $(ATP)_B$ obtenues dans les manipulations du type B sont plus importantes que celles produites dans les expériences du type C $(ATP)_C$. La différence $(ATP)_B - (ATP)_C$ est toujours supérieure à $(ATP)_A$, c'est à dire à la quantité d'ATP qui se forme à bas pH à partir du seul ADP intrachloroplastique.

Nous interprétons cette différence $(ATP)_B - [(ATP)_C + (ATP)_A]$ par l'existence d'un composé phosphorylé $X \sim P$ riche en énergie et précurseur de l'ATP . Cette interprétation cependant n'est valable que si on suppose le mélange des ions $H_2{}^{31}PO_4^-$ et $H_2{}^{32}PO_4^-$ parfait et immédiat, dans le milieu II, dans les expériences du type C.

Aux deux pH : 6 et 7,3, les quantités d'ATP formé dans les expériences du type J sont très voisines de celles formées dans les expériences de type C. $X \sim P$ pourrait tout aussi bien être évalué par la différence $(ATP)_B - (ATP)_J$.

Il n'en est plus de même à pH 4,45 où $(ATP)_C$ est supérieur à $(ATP)_J$.

Note : A pH 4,45 une partie de l'ATP synthétisé est due à la seule variation de pH de la suspension de chloroplastes (X'_e) mais à l'époque où cette expérience était faite ce phénomène n'était pas connu.

TABLEAU I

µM ATP/mg chlorophylle.

pH phase lumineuse	4,45	6	7,3	Interprétation
Type A $^{31}PO_4$ + $^{32}PO_4$ à la lumière HCl à l'obscurité	0	2	2,7	ATP intra-chloroplastique
Type B $^{31}PO_4$ + $^{32}PO_4$ à la lumière ADP à l'obscurité	49	24	10,5	$X_e + X'_e + X \sim P$ + ATP intra-chloroplastique
Type C $^{31}PO_4$ à la lumière $^{32}PO_4$ + ADP à l'obscurité	49	15	2,5	$X_e + X'_e$
Type J $^{31}PO_4$ + $^{32}PO_4$ + ADP à l'obscurité	37	13,6	2,2	$X_e + X'_e$
Type B - [type C + type A]	0	7	5,3	$X \sim P$

Protocole expérimental

1 ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle, 2.10^{-1} µM PMS, 3 µM $MgCl_2$, 12,5 µM de succinate-NaOH pour obtenir soit pH 4,45, soit pH 6, ou 12,6 µM de maléate-tris pour obtenir pH 7,3, 0 ou 2 µM de phosphate 0 ou 10 µCi de ^{32}P, est éclairé dans une seringue pendant 1 minute, puis injecté à l'obscurité soit dans 0,2 ml HCl N (type A), soit dans 0,7 ml de solution contenant 5 µM ADP, 0 ou 2 µM de phosphate, 0 ou 10 µCi ^{32}P et 80 µM de Tris-HCl à pH convenable pour amener la suspension à pH 8. Après 30 secondes d'agitation à l'obscurité, on ajoute 0,2 ml d'HCl 1 M.

b) Expériences avec de fortes concentrations en ions phosphate

Expérience I :

Nous comparons l'effet de concentrations variables et élevées en phosphate sur les photophosphorylations du type B et du type J.

La figure 14 représente les quantités d'ATP formé dans le cas des deux types de photophosphorylation, pour quatre concentrations en phosphate. Les quantités d'ions orthophosphates ajoutées aux suspensions de chloroplastes sont : 25, 50, 100 et 200 µM. Nous constatons que pour ces quatre concentrations la quantité d'ATP synthétisé dans les photophosphorylations du type J est supérieure à celle formée dans les expériences du type B $(ATP)_J > (ATP)_B$. Nous en déduisons que pour ces concentrations les ions orthophosphates inhibent la synthèse d'ATP lorsqu'ils sont présents pendant la phase lumineuse.

La figure 15 correspond à un mode de représentation différent des résultats déjà exprimés par la figure 14. Les deux droites traduisant les variations de l'inverse de la concentration en ATP en fonction de l'inverse de la concentration en phosphate se coupent en un point correspondant à une concentration en orthophosphate de 18 µM. En outre ces deux droites coupent l'axe des ordonnées en deux points distincts. Ces deux points correspondent aux quantités maximales d'ATP susceptibles d'être synthétisé à la saturation de la suspension en orthophosphate. Dans l'expérience que nous avons réalisée

$(ATP)_J$ maximum = 82 m µM ATP, µM chlorophylle^{-1}

$(ATP)_B$ maximum = 45 m µM ATP, µM chlorophylle^{-1}

Les résultats que traduisent les figures 14 et 15 nous amènent à constater que les ions phosphates jouent des rôles opposés selon qu'ils sont présents dans la suspension de chloroplastes pendant la seule phase obscure (J) ou pendant les deux phases : lumineuse et obscure (B).

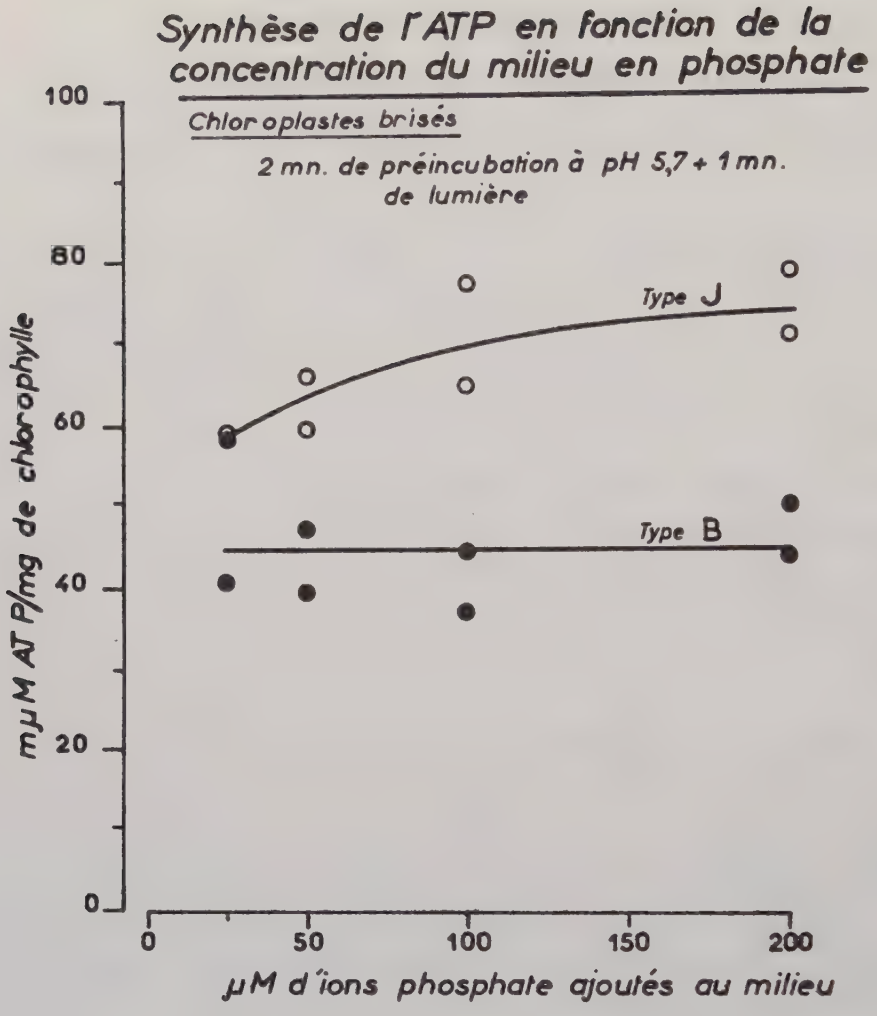
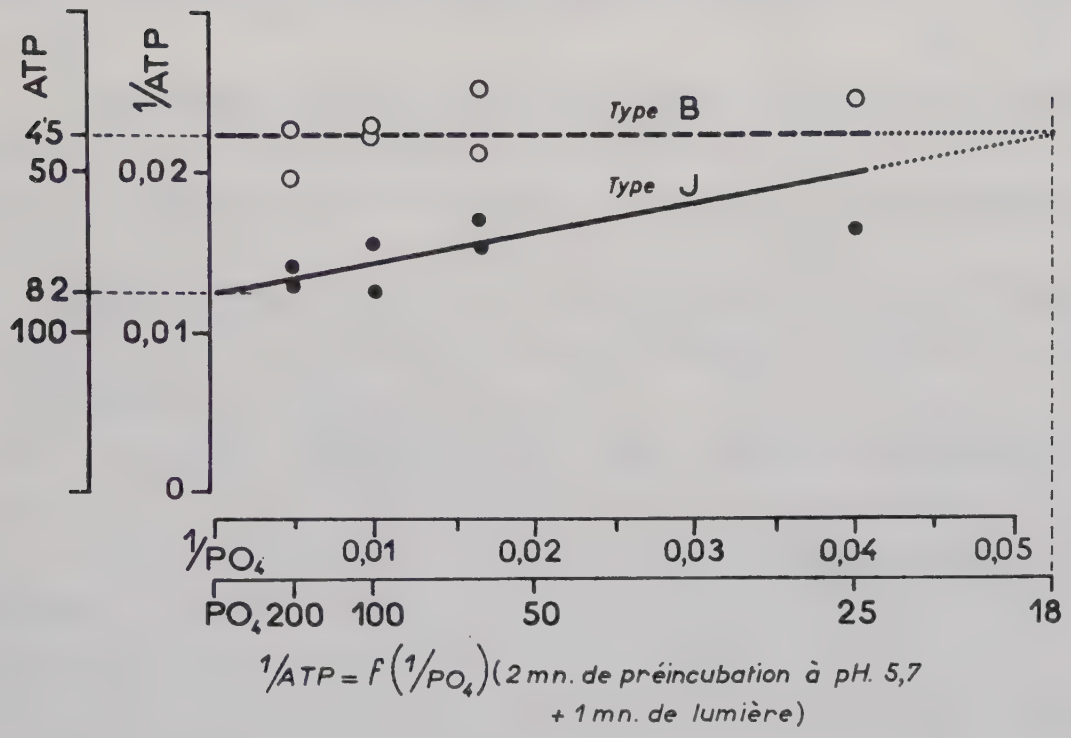


Fig. 14

Synthèse d'ATP en fonction de la concentration du milieu en ions orthophosphates.
Les ions orthophosphates sont ajoutés au milieu I, courbe type B.
Les ions orthophosphates sont ajoutés au milieu II, courbe type J.

Synthèse de l'ATP en fonction de la concentration du milieu en phosphate

Chloroplastes brisés



$1/ATP = f\left(1/PO_4\right)$ (2 mn. de préincubation à pH. 5,7 + 1 mn. de lumière)

Fig. 15

LEGENDES DES FIGURES 14 et 15 :

Les figures 14 et 15 représentent de deux façons différentes les mêmes résultats. Dans la figure 14 nous portons les quantités d'ATP formé en fonction des concentrations en ions orthophosphate. Dans la figure 15 nous portons l'inverse de la quantité d'ATP en fonction de l'inverse des concentrations en ions orthophosphates.

Protocole expérimental :

1 ml de suspension de chloroplastes dans le milieu I est agité pendant 2 minutes à l'obscurité. On éclaire pendant 1 minute, puis on éteint et ajoute, immédiatement après l'extinction, le milieu II, au moyen d'une seringue. On agite pendant 30 secondes et ajoute 0,2 ml HCl 2 M.

Composition du milieu I : chloroplastes : 1 mg de chlorophylle, 10 µM $MgCl_2$, 5.10^{-2} µM pyocyanine, 5 µM succinate, vol. 1 ml., pH 5,7.

Composition du milieu II : ADP 5 µM, Tris-HCl 70 µM à pH convenable pour obtenir un pH final de 8, vol. 1 ml.

Les solutions contenant les ions orthophosphates sont ajoutées au milieu I ou II (B ou J), aux pH correspondant à chacun des milieux. Les quantités ajoutées soit au milieu I (type B), soit au milieu II (type J) sont : 25, 50, 100 et 200 µM de phosphate. Les pH de chacun des essais et de chaque milieu étaient vérifiés sur des suspensions témoins. Des quantités de ^{32}P variant de 20 à 100 µC sont ajoutées en même temps que le phosphate froid.

La figure 14 montre que :

- lorsque le phosphate est présent seulement pendant la phase obscure dans le milieu à pH 8, la quantité d'ATP formé augmente en même temps que la concentration en phosphate, (type J).

- lorsque le phosphate est ajouté dès le début de la minute d'éclairement, il joue un rôle inhibiteur, aux concentrations utilisées (type B).

La représentation adoptée pour les graphes de la figure 15 nous permet de préciser les domaines de concentrations correspondant aux rôles activateur et inhibiteur des ions orthosphosphates, le point d'intersection des deux droites délimitant chacun de ces domaines.

Pour des concentrations en $H_2PO_4^-$ inférieures à 18 µMoles, on observe une synthèse d'ATP plus importante lorsque le phosphate est présent dès le début de la phase lumineuse que lorsqu'il est ajouté dans le milieu à pH 8 pendant la phase obscure .

Au contraire, pour des concentrations en $H_2PO_4^-$ supérieures à 18 µM, la différence $(ATP)_J - (ATP)_B$ augmente en même temps que croit la concentration en $H_2PO_4^-$.

Afin de confirmer la validité des résultats précédents relatifs à l'existence de deux domaines de concentration des ions $H_2PO_4^-$ correspondant l'un à un rôle activateur, l'autre à un rôle inhibiteur de ces ions pendant la phase lumineuse, nous avons effectué une expérience analogue : mais nous sommes partis de concentrations très faibles en $H_2PO_4^-$ pour finalement arriver à des concentrations du même ordre que dans l'expérience I.

Expérience II :

Les figures 16 et 17 représentent la synthèse d'ATP en fonction de la teneur du milieu en ions phosphate dans les photophosphorylations du type J et B, et cela avec des chloroplastes "entiers" (figure 16) et des chloroplastes "cassés" (figure 17).

L'éventail des concentrations en phosphate étant plus ouvert que précédemment, nous observons directement le point d'intersection des deux courbes J et B représentant les variations de la quantité d'ATP formé en fonction de la concentration en ions orthophosphate.

Ce point correspond à une teneur de la suspension en phosphate qui est de l'ordre de 100 µM pour des chloroplastes "entiers" et 50 µM pour des chloroplastes "cassés".

Dans la première expérience, ce point avait été obtenu par extrapolation et correspondait à 18 µM de phosphate seulement.

Cette différence entre les deux expériences peut avoir plusieurs causes : en premier lieu les lots de chloroplastes ne sont jamais identiques. Ensuite, tandis que dans l'expérience I les chloroplastes ont été soumis à une préincubation à l'obscurité, il n'en a pas été de même dans l'expérience II. En conséquence, dans ce dernier cas, le phosphate présent pendant la phase lumineuse de l'expérience B a probablement beaucoup moins pénétré à l'intérieur des chloroplastes et sa concentration au voisinage des sites d'activation était moindre que dans la première expérience.

Cependant ces deux expériences nous amènent à la même conclusion : le phosphate, lorsqu'il est présent dans le milieu I de bas pH, lors de la phase lumineuse, entraine, à concentration croissante, des formations accrues d'ATP -jusqu'à ce que soit atteinte une certaine concentration limite.

Au-dessus de ce seuil, l'augmentation de la concentration en phosphate dans le milieu I provoque une inhibition de la formation d'ATP. Cette inhibition ne peut être imputée à la force ionique variable du milieu I, car à force ionique constante, maintenue avec du chlorure de potassium, la synthèse d'ATP en fonction de la quantité de phosphate ajouté au milieu I passe par un maximum pour 50 µM de phosphate. Au delà, cette courbe décroit et il y a inhibition par les fortes quantités de phosphate (cette courbe n'est pas représentée dans le texte).

Au contraire, lorsque le phosphate n'est présent que dans le milieu II à pH 8, pendant la phase obscure, la quantité d'ATP formée augmente en même temps que croit la concentration en phosphate.

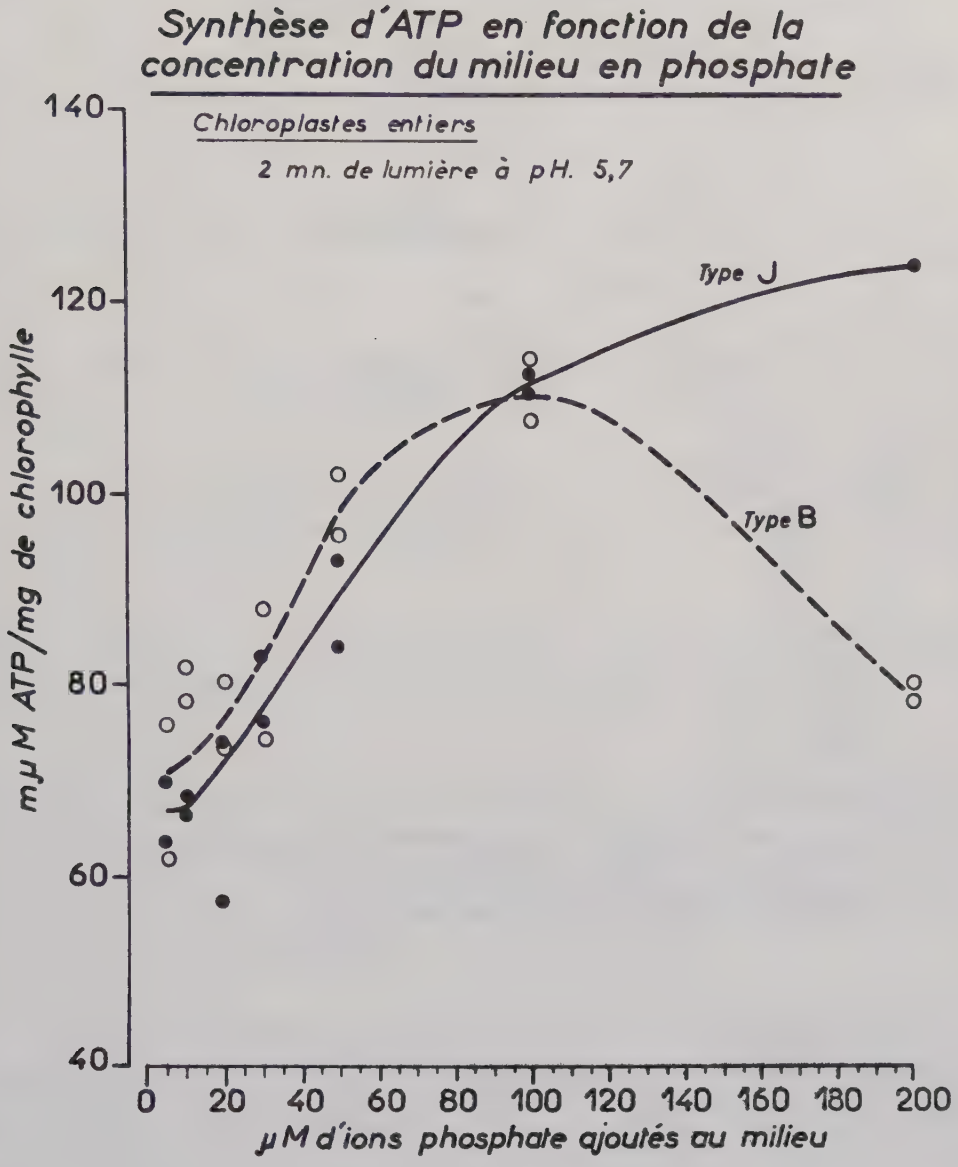


Fig. 16

Synthèse d'ATP chez des chloroplastes "entiers" en fonction des quantités d'orthophosphate ajouté soit au milieu I (type B), soit au milieu II (type J).

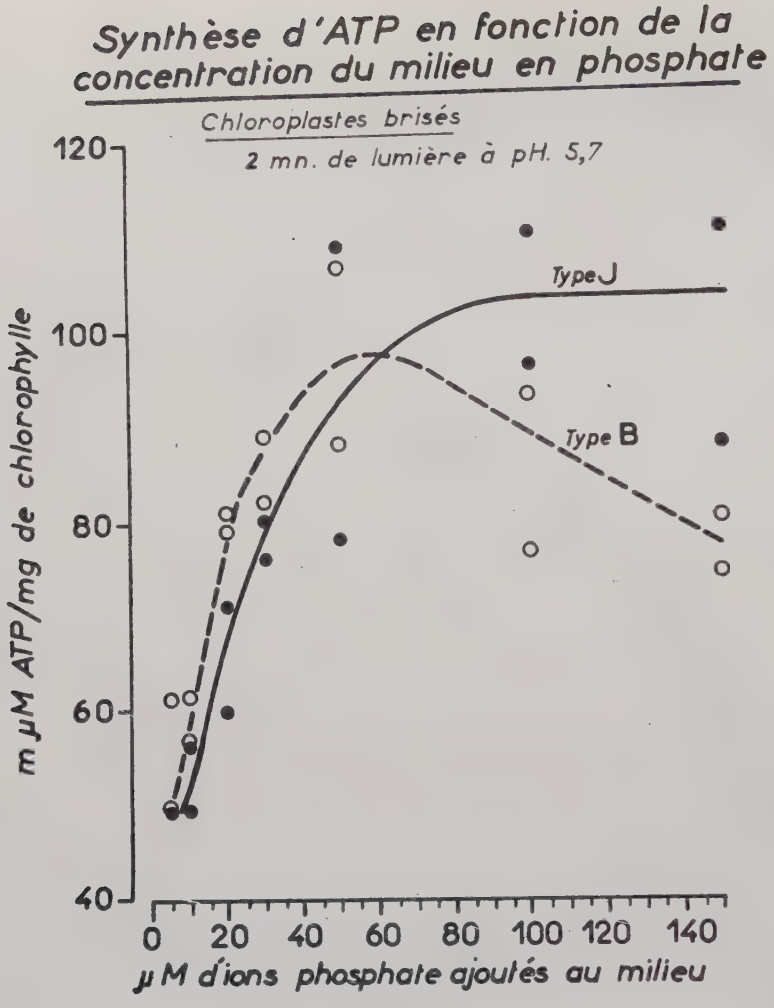


Fig. 17

Synthèse d'ATP chez des chloroplastes "cassés" (grana)en fonction des quantités d'orthophosphate ajouté, soit au milieu I (type B), soit au milieu II (type J).

LEGENDES DES FIGURES 16 et 17 :

Le protocole expérimental est essentiellement le même que celui décrit avec la figure 14. Pour ces deux expériences, les chloroplast n'ont pas été préincubés à l'obscurité. Ils ont été éclairés pendant 2 minutes en présence du milieu I.

Les milieux I et II sont les mêmes que ceux décrits avec la Figure 1

Ainsi, à partir de la concentration seuil pour laquelle les courbes J et B se coupent, la différence $(ATP)_J - (ATP)_B$ croit.

Dans le cas où le phosphate est présent à faible concentration dans le milieu de bas pH au cours de la phase lumineuse, le fait que $ATP_B > ATP_J$ peut s'expliquer :

soit par l'existence d'un composé $X \sim P$ riche en énergie précurseur de l'ATP ;

soit par un accès plus facile du phosphate aux sites d'activation X_e à la lumière qu'à l'obscurité.

Dans le cas où le phosphate est présent à forte concentration dans le milieu de bas pH au cours de la phase lumineuse, on peut penser que :

la présence de trop fortes quantités d'ions $H_2PO_4^-$ entraine :
soit une moindre formation de X_e, soit sa destruction,

D) INFLUENCE DE LA TENEUR DE LA SUSPENSION DE CHLOROPLASTES EN IONS ORTHOPHOSPHATES, SOIT DANS LE MILIEU A BAS pH, SOIT DANS LE MILIEU A pH 8, SUR LA SYNTHESE D'ATP OBTENUE A L'OBSCURITE PAR VARIATION DE pH (X'_e)

Nous avons étudié la synthèse d'ATP à l'obscurité lors d'un passage de pH 4,5 à pH 8 d'une suspension de chloroplastes, lorsque le phosphate était ajouté en quantité variable soit au milieu I, à pH 4,5, soit au milieu II à pH 8. La figure 18 montre les résultats obtenus.

La synthèse d'ATP augmente en fonction de la concentration du milieu en phosphate dans les deux types de phosphorylation. La forme des courbes n'est pas la même, mais nous n'observons pas d'inhibition de la synthèse d'ATP par de fortes concentrations en phosphate, lorsque celui-ci est ajouté dans le milieu I.

X_e et X'_e réagissent donc différemment à la présence de fortes concentrations en phosphate.

Ce résultat confirme ceux du paragraphe précédent et s'inscrit lui aussi en faveur d'une nature différente des sites impliqués dans la formation de X_e et de X'_e.

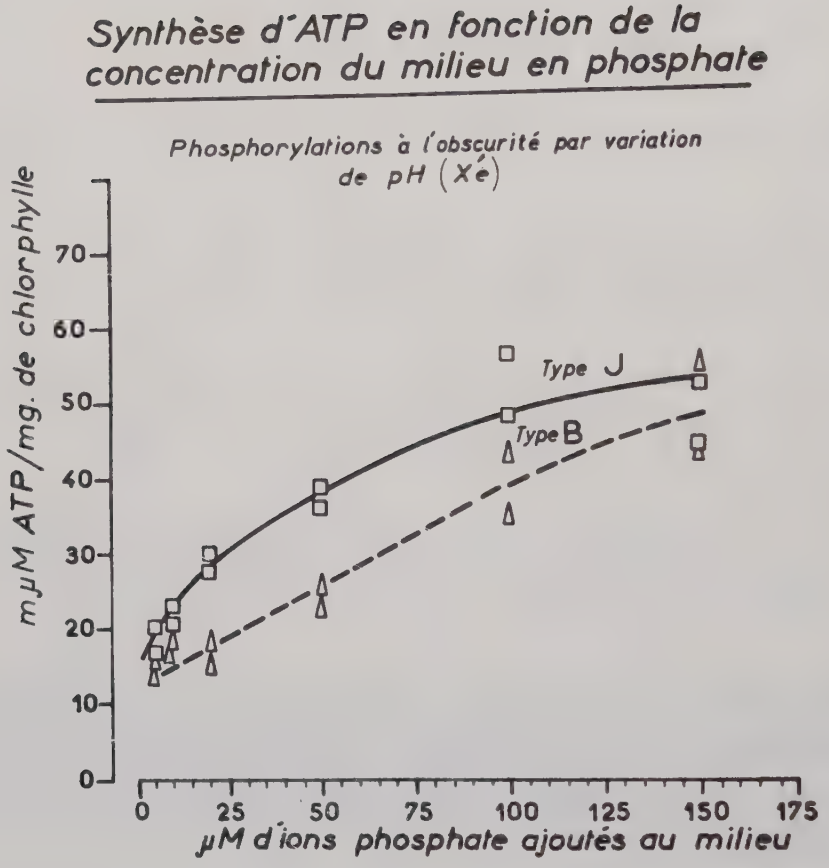


Fig. 18

Synthèse d'ATP obtenue, par variation de pH sans éclairement, en fonction des quantités d'orthophosphate ajouté soit au milieu I (type B) soit au milieu II (type J).

LEGENDE DE LA FIGURE 18 :

Phosphorylations à l'obscurité (sans éclairement dans le milieu I) par variation de pH, du type J.

1ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle, 10 µM de $MgCl_2$, 5 µM d'acide succinique-NaOH pH 4,5 (le pH final de la suspension est 4,5) est agité à l'obscurité pendant 5 minutes. A la fin de cette période, on ajoute toujours à l'obscurité 1 ml de solution contenant 5 µM d'ADP ; 5, 10, 20, 50, 100 ou 150 µM de phosphate ; 20, 50 ou 100 µCi de ^{32}P et 70 µM de Tris-HCl à pH convenable pour amener la suspension de chloroplastes à pH 8. On agite pendant 30 secondes à l'obscurité et arrête les réactions avec 0,2 ml d'HCl 2 M.

Phosphorylations à l'obscurité (sans éclairement dans le milieu I) par variation de pH, du type B.

Le protocole expérimental est essentiellement le même que ci-dessus, à ceci près que l'on ajoute le phosphate (^{31}P + ^{32}P) dans le milieu à pH 4,5 et dans le cas de concentrations élevées en phosphate, pour amener la suspension à pH 8 on ajoute de la soude au milieu II. (Le pH de chacune des suspensions de chloroplastes à pH 4,5 et à pH 8 sont vérifiés sur des suspensions de chloroplastes témoins).

E) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS MAGNESIUM, DE LA SUSPENSION DE CHLOROPLASTES, SUR LA SYNTHESE d'ATP.

Nous étudions l'influence de la concentration en ions magnésium de la suspension de chloroplastes sur la synthèse d'ATP lorsque le phosphate est présent dès le début de la phase lumineuse, dans le milieu I à bas pH (photophosphorylation du type B), et lorsqu'il est présent seulement pendant la phase obscure, à pH 8 (photophosphorylation du type J).

Les deux équilibres suivants régissent les concentrations en ions libres présents dans les suspensions de chloroplastes à pH 6 et à pH 8.

$$Mg\ H\ PO_4 \overset{k_1}{\rightleftharpoons} Mg^{++} + H\ PO_4^{=} \qquad \text{avec } pk_1 = 1{,}88$$

et

$$H_2\ PO_4^{-} \overset{k_2}{\rightleftharpoons} H^{+} + H\ PO_4^{=} \qquad pk_2 = 6{,}78$$

Les calculs conduisant à l'évaluation des quantités d'ions phosphate d'une part, et d'ions magnésium d'autre part, en fonction des quantités de sel de magnésium (chlorure de magnésium) et de phosphate (mélange de phosphate monopotassique et disodique) ajoutés à la suspension, se trouvent dans l'annexe de ce chapitre.

Les expériences suivantes nous ont conduites à étudier le rôle joué par les ions magnésium sur la synthèse d'ATP.

Nous avons ajouté des quantités variables de chlorure de magnésium au milieu I de pH 6, dans lequel se trouvent les chloroplastes pendant la phase lumineuse.

Puis dans une première expérience nous avons ajouté une quantité élevée de phosphate (120 µM) au milieu I à la lumière (photophosphorylation du type B) et dans une deuxième expérience la même quantité de phosphate au milieu II à l'obscurité (photophosphorylation du type J). Les tableaux II et III montrent les quantités d'ATP synthétisé dans les deux expériences en fonction de la quantité de sel de magnésium ajouté au milieu.

TABLEAU II

Photophosphorylations du type B

µM $MgCl_2$ ajouté au milieu I	µM d'ions Mg^{++} présents dans le milieu I	µM de phosphate ajouté au milieu I	µM d'ions phosphate présents dans le milieu I	m µM ATP/ mg de chlorophylle
10	4,5	120	114	105
50	25	120	95	125
100	55	120	75	133

TABLEAU III

Photophosphorylations du type J

µM $MgCl_2$ ajouté au milieu I	µM d'ions Mg^{++} présents dans le milieu I	µM de phosphate ajouté au milieu II	µM d'ions phosphate présents dans le milieu II	m µM ATP/ mg de chlorophylle
10	10	120	112	69
50	50	120	83	53
100	100	120	55	38

LEGENDE DU TABLEAU II :

1 ml de suspension de chloroplastes contenant 920 µg de chlorophylle 10, 50 ou 100 µM de chlorure de magnésium , 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 5 µM d'acide succinique - NaOH : pH 5,9 et 120 µM de phosphate (mélange de H_2 K PO_4 et H Na_2PO_4) : pH 5,9 , 100 µCi ^{32}P , (milieu I de pH final 5,9) est éclairé et agité pendant 2 minutes. A la fin de l'éclairement 1 ml de solution contenant 5 µM d'ADP, 70 µM Tris et une quantité suffisante de NaOH pour amener le pH final à 8 (milieu II) est ajouté à la suspension de chloroplastes. L'ensemble est agité pendant 30 secondes à l'obscurité. Puis on ajoute 0,2 ml de HCl 2 M pour arrêter les réactions.

LEGENDE DU TABLEAU III :

Le protocole expérimental est le même que pour celui du Tableau II, mais le phosphate (120 µM) est ajouté dans le milieu II pendant la phase obscure.

Note : Les expériences représentées sur les tableaux II et III ont été effectuées avec deux lots différents de chloroplastes. C'est la raison pour laquelle nous ne pouvons relier entre elles les quantités d'ATP synthétisé dans les deux cas.

résultats. Les ions magnésium jouent un rôle différent sur les photophosphorylations du type B et du type J. Dans le premier cas, l'accroissement de la quantité d'ions magnésium augmente la synthèse d'ATP. En effet, celle-ci croit en même temps que le nombre d'ions magnésium présents pendant la phase lumineuse. Pourtant nous remarquons que la quantité d'ions phosphate dans le milieu I ou II) diminue lorsque la quantité d'ions magnésium augmente.

Dans le deuxième cas, celui des photophosphorylations du type J, lorsque les ions magnésium augmentent, la quantité d'ATP synthétisé diminue en même temps que la quantité d'ions phosphate présent dans le milieu.

L'inhibition de la synthèse d'ATP dans les photophosphorylations du type J peut être rapprochée des résultats obtenus sur l'apparition et la disparition du $\triangle$ pH lors de l'étude de l'influence de la concentration en ions magnésium sur ce phénomène.

Le tableau IV montre les quantités de protons fixés par une suspension de chloroplastes et les durées de vie du $\triangle$pH en fonction de la concentration du milieu en chlorure de magnésium.

Afin de vérifier si les variations de $\triangle$pH et de ses demi-vies n'étaient pas dues à une variation de la force ionique du milieu, nous avons travaillé à force ionique constante : $\Gamma/2 = 0{,}30$, pour deux concentrations en chlorure de magnésium : 10 et 100 µM/ml. La force ionique du milieu est amenée à une valeur constante par addition de chlorure de potassium. Le tableau V résume les résultats obtenus.

Les résultats qui figurent aux tableaux IV et V nous montrent d'une part : que le $\triangle$pH diminue lorsque la force ionique augmente, d'autre part, que sa demi-vie diminue lorsque la concentration en chlorure de magnésium augmente, même à force ionique constante.

Ces résultats sont à rapprocher du parallélisme observé entre le $\triangle$pH et l'apparition de X_e et décrit dans le chapitre V. En effet, en comparant les tableaux III et IV , nous voyons qu'il y a une diminution de la synthèse d'ATP pour les photophosphorylations du type J et une diminution du nombre de protons fixés par les

TABLEAU IV

Protons fixés par les chloroplastes et demi-vie du $\triangle$pH en fonction de la concentration en chlorure de magnésium.

$\mu M\ MgCl_2$, ml^{-1}	$\Gamma/2$	m $\mu M\ H^+$, mg^{-1} chlorophylle	$t_{1/2}$ en secondes
10	0,03	990	29
50	0,15	745	18
100	0,30	663	12

LEGENDE DU TABLEAU IV

14 ml contenant : 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 10, 50 ou 100 µM de chlorure de magnésium et 35 µg de chlorophylle par ml, sont éclairés dans une enceinte refroidie (voir techniques et méthodes) le temps nécessaire pour obtenir un pH constant. Après extinction on attend que le pH de la suspension soit revenu à sa valeur initiale. On enregistre les variations de pH pendant toute la durée de l'expérience. On mesure pour chaque concentration en chlorure de magnésium le pouvoir tampon de la suspension de chloroplaste en ajoutant une quantité connue de soude et détermine la demi-vie des trois $\triangle$pH en traçant les courbes log(pH) en fonction du temps de décroissance du pH. Les points s'alignant sur des droites, on obtient facilement la demi-vie du $\triangle$pH, pour chacune des trois concentrations en chlorure de magnésium.

TABLEAU V

Protons fixés par les chloroplastes et demi-vie du $\triangle$pH en fonction de la concentration en chlorure de magnésium, à force ionique constante.

µM $MgCl_2$, ml^{-1}	$\Gamma/2$	m µM H^+, mg^{-1} chlorophylle	$t_{1/2}$ en secondes
10	0,3	663	19
100	0,3	665	12

LEGENDE DU TABLEAU V :

Le protocole expérimental est le même que celui décrit avec le tableau IV ; la seule différence réside dans le maintien de la force ionique à 0,3 avec du chlorure de potassium dans le cas de la suspension de chloroplastes contenant 10 µM de chlorure de magnésium par ml.

chloroplastes lorsque la quantité de chlorure de magnésium augmente dans le milieu (les deux expériences ont été réalisées sans avoir maintenu la force ionique constante).

Nous observons aussi une diminution de la demi-vie de X_e (dans les expériences du type J) Fig. 21 pg.82 et celle de la demi-vie du ΔpH, tableau V, pg.75, lorsque la concentration des ions magnésium augmente.

On peut donc penser que l'accroissement de la concentration en chlorure de magnésium a diminué la quantité de X_e formé et sa demi-vie Mais les calculs(voir Annexe I) nous montrent que l'augmentation de la concentration des ions magnésium dans le milieu, fait diminuer le nom d'ions phosphate dans le milieu II, en complexant sous forme de PO_4HM une partie des ions phosphate ajoutés ; et ce dans des proportions d'autant plus importantes que la quantité d'ions magnésium ajoutés est grande.

Ces trois facteurs concourent donc pour diminuer la synthèse d'A dans les photophosphorylations du type J.

Il n'en est pas de même pour les photophosphorylations du type B puisque la quantité d'ATP augmente en même temps que la concentration en chlorure de magnésium du milieu (voir tableau II). Les trois résul pris en considération ci-dessus, c. à d. diminution

1° de la synthèse d'ATP (tableau III)

2° de la demi-vie de X_e (Fig. 21)

3° de la quantité d'ions phosphate dans le milieu (tableau II, Anne lorsque la concentration en ions magnésium du milieu augmente, devraie contribuer à diminuer la synthèse d'ATP, même lorsque le phosphate se trouve présent dans le Milieu I (type B). Pourtant celle-ci augmente.

Les ions magnésium contribueraient donc en présence de phosphate à pH 6 à révéler (ou à former) un composé ou une structure capable de synthétiser une quantité supplémentaire d'ATP à pH 8.

Dans les expériences du type B, en présence de fortes quantités d'ions:magnésium et phosphate, nous obtenons une synthèse de pyrophos et cela déja dans le milieu I à pH 6. En effet si après avoir éclairé pendant deux min. une suspension de grana maintenue à pH 6 en présenc pyocyanine (5.10^{-5}M), tampon succinate pH 5,9 (5.10^{-3}M), Cl_2Mg (10^{-1} et de phosphate ($^{31+32}P$) ($1,5.10^{-5}$M), nous arrettons les réactions avec 1 M, nous observons une synthèse de pyrophosphate.

Ceci montre que les fortes quantités d'ions magnésium favorisent c le chloroplaste mis en présence d'une quantité élevée de phosphate l'activation de ce dernier. Le phosphate peut donc etre activé à pH 6 dans des conditions favorables.

Synthèse d'ATP et de pyrophosphate en fonction de la concentration du milieu en ions phosphate libres

(En présence de 100 µM de chlorure de magnésium)

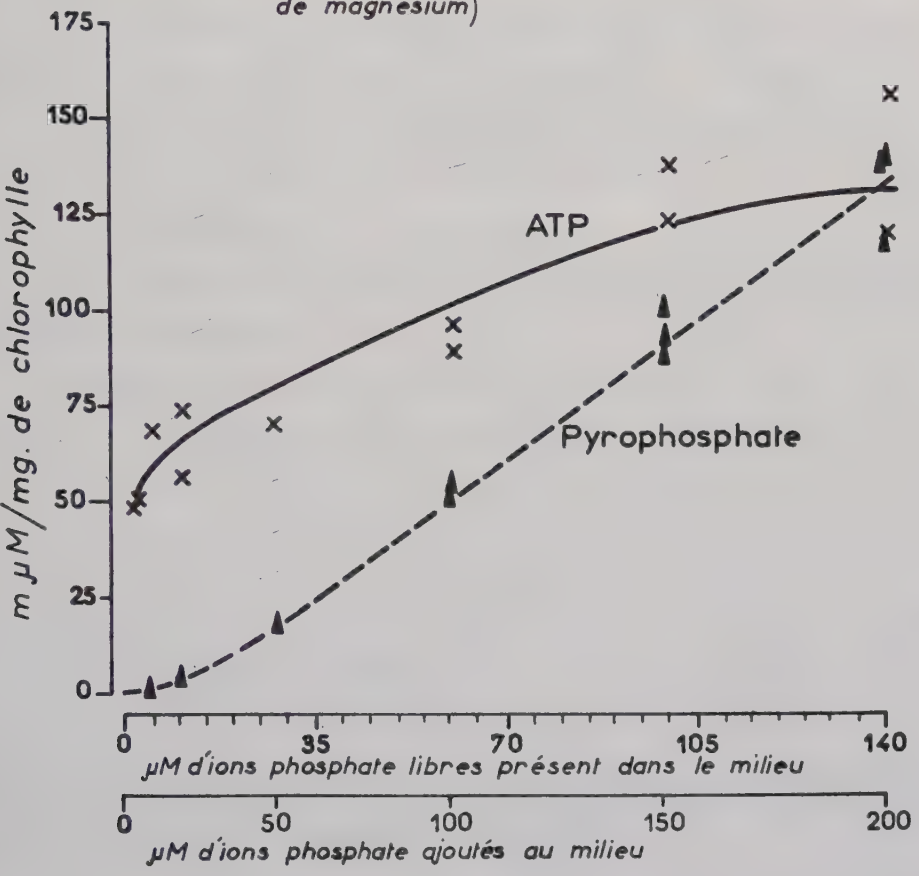


Fig. 19

LEGENDE DE LA FIGURE 19 :

Synthèse d'ATP et de pyrophosphate dans les photophosphorylations du type B , en fonction de la quantité d'ions phosphate présents dans le milieu I .

Protocole expérimental

1 ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle, 100 µM de chlorure de magnésium, 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 5 µM d'acide succinique - NaOH : pH 5,9 , de 5 à 200 µM de phosphate de potassium, 5 à 150 µCi de ^{32}P, et une quantité suffisante de soude pour amener le pH final à 5,9, est éclairé et agité pendant 2 minutes. A la fin de l'éclairement, on ajoute 1 ml de solution contenant 5 µM d'ADP, 70 µM de Tris-HCl (ou NaOH) à pH convenable pour obtenir un pH final de la suspension de 8. On agite à l'obscurité 30 secondes puis ajoute 0,2 ml de HCl 2 M pour arrêter les réactions.
(Pour chaque concentration de phosphate, la concentration des ions magnésium en solution varie. Pour leur évaluation, se rapporter au tableau III de l'Annexe I).

Dans l'expérience représentée sur la figure 19 nous voyons que l'inhibition de la synthèse d'ATP, par les fortes concentrations en phosphate (Fig.16 et 17) est levée lorsque la suspension de chloroplastes se trouve en présence d'une quantité élevée et suffisante d'ions magnésium.

La figure 19 représente la synthèse d'ATP et du pyrophosphate en fonction de la concentration en ions phosphate du milieu I (type B) en présence d'une quantité élevée de chlorure de magnésium (100 µM).

Nous constatons que la synthèse d'ATP augmente en même temps que la concentration en ions phosphate. Ces derniers apparaissent donc comme étant le facteur limitant de la production d'ATP dans les expériences du type B, quand la concentration en magnésium est faible.

Les ions magnésium lèvent l'inhibition des photophosphorylations du type B par les fortes concentrations en phosphate.

Ces mêmes ions magnésium présents en quantité élevée permettent la synthèse du pyrophosphate, cette synthèse augmentant lorsque la concentration en phosphate augmente dans le milieu I, c'est à dire dans le cas des photophosphorylations du type B. (Nous n'avons pas observé de synthèse de pyrophosphate lorsque l'orthophosphate est ajouté dans le milieu II, à l'obscurité : photophosphorylation du type J).

F) ETUDE DES DEMI-VIES DES COMPOSES ACTIVES A LA LUMIERE EN PRESENCE ET EN ABSENCE D'IONS ORTHOPHOSPHATES

Puisque l'allure des courbes (Fig. 16 et 19) représentant la synthèse de l'ATP en fonction de la concentration du milieu à pH 6 en phosphate est différente lorsque celui-ci contient de faibles ou de fortes quantités de chlorure de magnésium, il semblerait qu'il se forme dans certaines conditions un composé plus stable que X_e, dont la synthèse soit favorisée par la présence d'ions magnésium. Ce composé pourrait d'ailleurs contenir du magnésium et du phosphate dans sa structure.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons étudié [49] d'une part les demi-vies des composés (ou des états) formés à la lumière en présence ou en l'absence d'ions phosphate (photophosphorylations du type B et J) mais dans les deux cas en présence de concentrations élevées en chlorure de magnésium.

D'autre part nous avons étudié les demi-vies des composés formés à la lumière soit en présence, soit en absence d'ions phosphate, en fonction de la concentration du milieu en chlorure de magnésium.

La figure 20 représente les quantités d'ATP synthétisé en fonction du temps passé par la suspension de chloroplastes à l'obscurité dans le milieu à pH 6, après 2 minutes d'éclairement. Le milieu à pH 8 n'est ajouté qu'après 0, 10, 30, ou 60 secondes d'obscurité. Les droites sont obtenues en portant le logarithme de la quantité d'ATP en m µM , en fonction de la période d'obscurité qui suit les 2 minutes d'éclairement.

L'expérience est faite avec les deux types de phosphorylations B et J, c'est à dire en présence de phosphate dans le milieu à pH 6, ou en absence de phosphate dans ce même milieu. Dans les deux cas nous sommes en présence de concentrations élevées en chlorure de magnésium (10^{-1}M).

Nous constatons que les demi-vies des composés activés par la lumière en présence et en absence d'ions phosphate ne sont pas les mêmes. La demi-vie du composé activé par la lumière en présence de phosphate est plus grande que celle du composé activé en absence de phosphate.

$$t_{1/2}(B) = 31 \text{ secondes}$$

$$t_{1/2}(J) = 17 \text{ secondes}$$

L'étude des demi-vies des composés formés en présence ou en absence d'ions phosphate en fonction de la concentration du milieu à pH 6 en chlorure de magnésium est représentée sur la figure 21 et la figure 22 .

Durée de vie des composés activés à la lumière

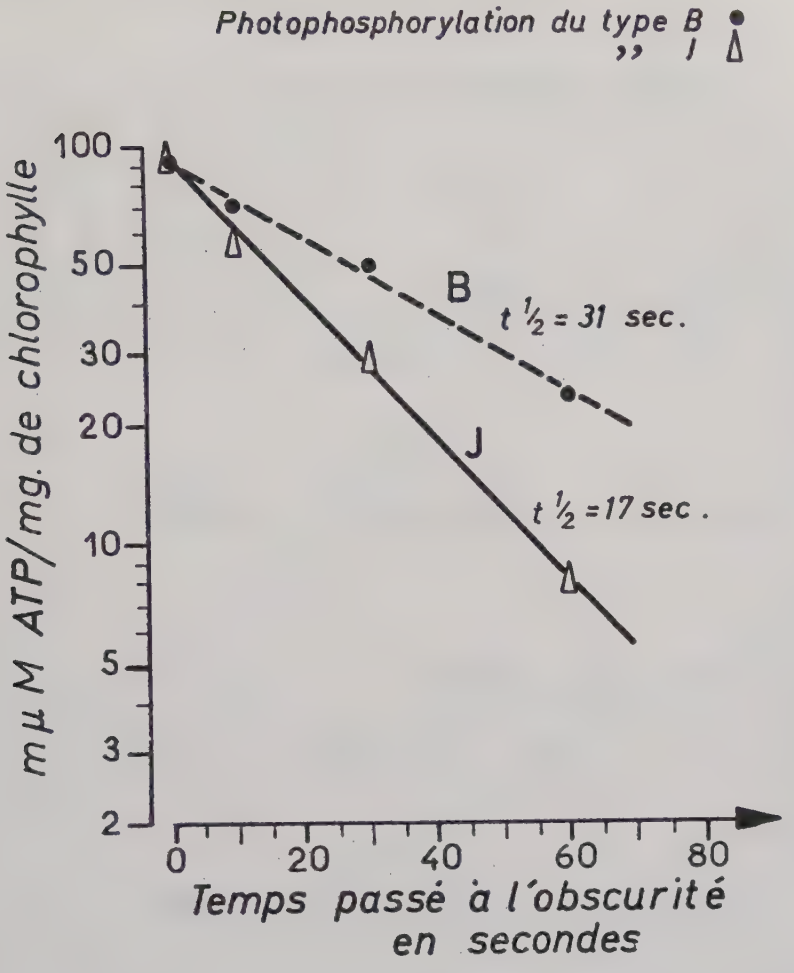


Fig. 20

EGENDE DE LA FIGURE 20 :

notophosphorylations du type J.

rotocole expérimental :

ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle, .10^{-2} µM de pyocyanine, 100 µM de $MgCl_2$, 5 µM d'acide succinique-aOH : pH 5,9, est éclairé et agité pendant 2 minutes, puis laissé à 'obscurité pendant 0, 10, 30 et 60 secondes. A la fin de chaque temps n ajoute 1 ml de solution contenant 5 µM ADP, 100 µM de phosphate 50 µCi de ^{32}P et 70 µM de Tris-HCl à pH convenable de sorte que la uspension de chloroplastes soit amenée à pH 8. On agite la suspension endant 30 secondes à l'obscurité puis ajoute 0,2 ml d'HCl 2 M pour rrêter les réactions.

notophosphorylations du type B.

e protocole expérimental est essentiellement le même que celui décrit i-dessus, à ceci près que l'on ajoute 100 µM de phosphate et 150 µCi e ^{32}P dans le milieu I, tout en maintenant le pH à 5,9.

Durées de vie du composé activé à la lumière

Photophosphorylation du type J

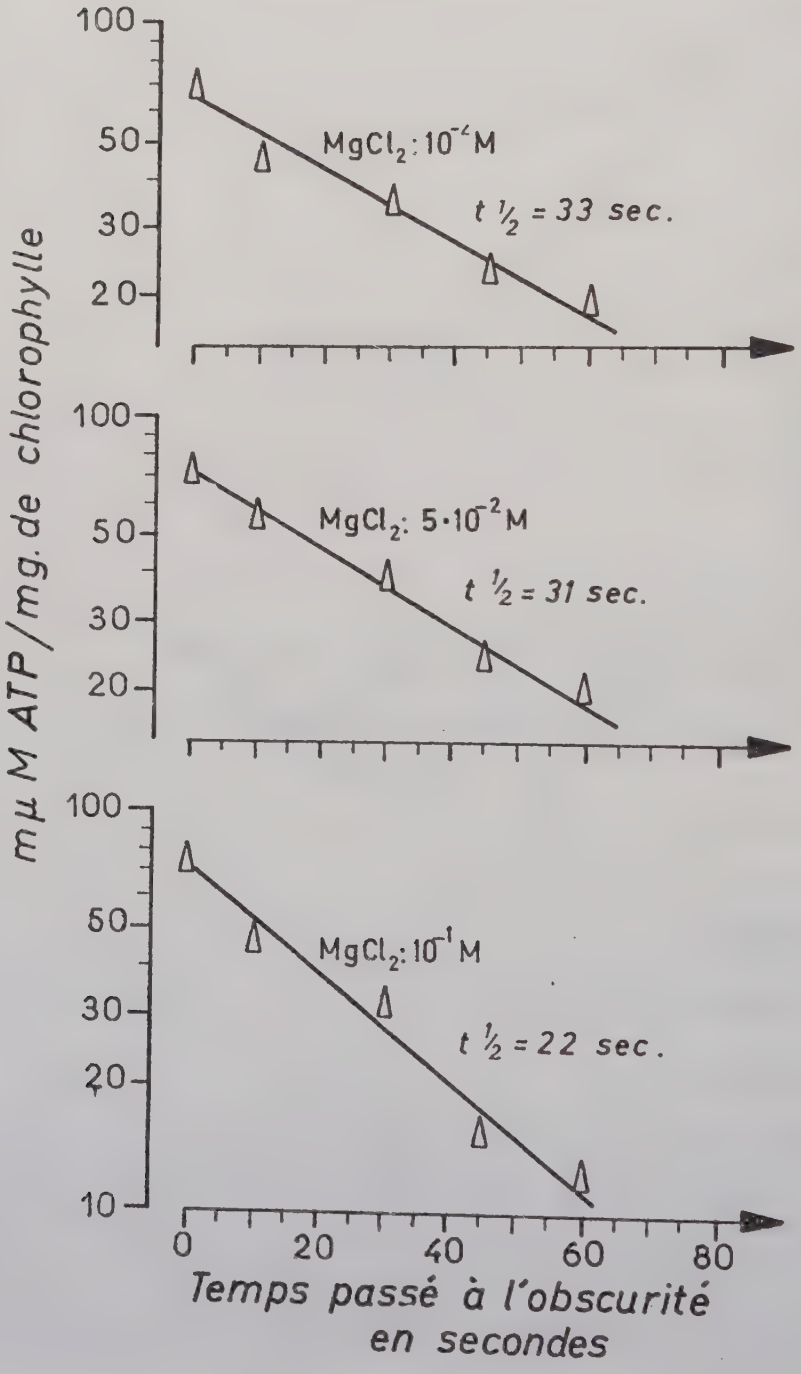


Fig. 21

LEGENDE DE LA FIGURE 21 :

Photophosphorylations du type J .

1 ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle, 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 5 µM d'acide succinique - NaOH pH 5,9 et 10, 50 ou 100 µM de $MgCl_2$, est éclairé et agité pendant 2 minutes, puis laissé à l'obscurité pendant 0, 10, 30, 45 et 60 secondes. A la fin de chaque temps on ajoute 1 ml de solution contenant 15 µM ADP, 100 µM de phosphate, 150 µCi de ^{32}P et 70 µM de Tris-HCl à pH convenable en sorte que la suspension de chloroplastes soit amenée à pH 8. On agite la suspension pendant 30 secondes, puis ajoute 0,2 ml d'HCl 2 M pour arrêter les réactions.

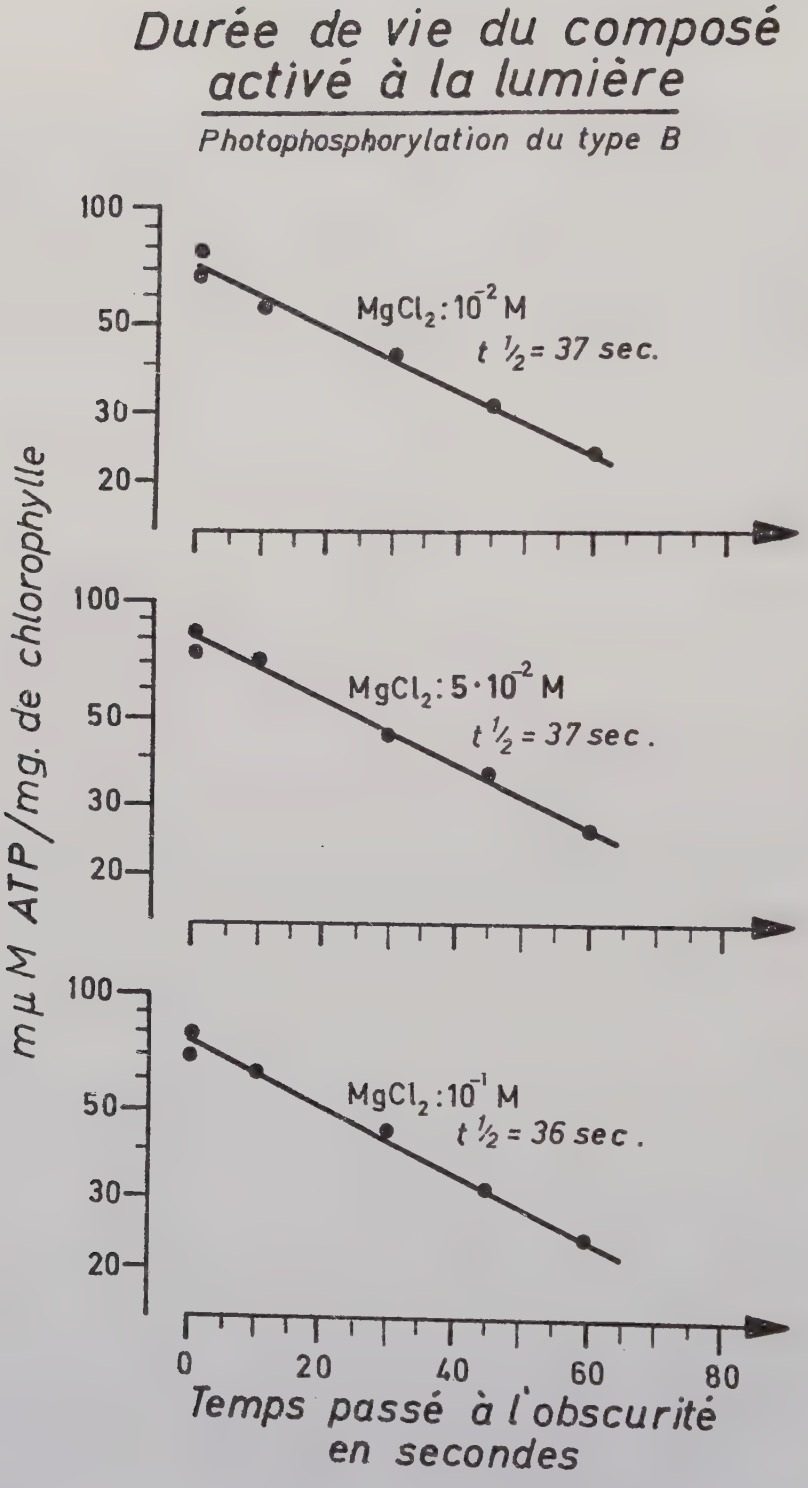

Durée de vie du composé activé à la lumière
Photophosphorylation du type B
mμ M ATP/mg. de chlorophylle
100
50
30
20
MgCl2 : 10-2 M
t ½ = 37 sec.
MgCl2 : 5·10-2 M
t ½ = 37 sec.
MgCl2 : 10-1 M
t ½ = 36 sec.
0
20
40
60
80
Temps passé à l'obscurité en secondes

Fig. 22

LEGENDE DE LA FIGURE 22 :

Photophosphorylations du type B.

1 ml de suspension de chloroplastes contenant 1 mg de chlorophylle 5.10^{-2} µM de pyocyanine, 5 µM d'acide succinique-NaOH pH 5,9, 10, 50 ou 100 µM de $MgCl_2$, 100 µM de phosphate et 150 µCi de ^{32}P est éclairé et agité pendant 2 minutes, puis laissé à l'obscurité pendant 0, 10, 30, 45 et 60 secondes. A la fin de chaque temps on ajoute 1 ml de solution contenant 20 µM ADP, 70 µM de Tris et une quantité suffisante de NaOH 0,2 M pour amener le pH final de la suspension à 8. On agite la suspension pendant 30 secondes, puis ajoute 0,2 ml d'HCl 2 M pour arrêter les réactions.

La figure 21 représente les quantités d'ATP synthétisé dans les phosphorylations du type J , en fonction du temps passé par les chloroplastes à l'obscurité après 2 minutes d'éclairement. Les 3 droites sont obtenues pour des concentrations de 10^{-2}, 5.10^{-2} et 10^{-1}M de chlorure de magnésium dans le milieu I à pH 6.

Nous voyons que la demi-vie du composé activé par la lumière diminue lorsque la concentration en chlorure de magnésium passe de 10^{-2} à 10^{-1}M. Les concentrations trop élevées en ions magnésium ne sont pas favorables à la stabilité de X_e . Ce résultat est à comparer avec celui obtenu avec le $\triangle$pH (tableau IV). Dans les deux cas (X_e et $\triangle$pH) les ions magnésium à concentration élevée font diminuer la stabilité des composés formés à la lumière.

Les résultats obtenus dans la Figure 21 nous montrent que le composé activé à la lumière en absence d'ions phosphate (X_e) a une demi-vie qui décroit, lorsque la concentration des ions magnésium du milieu croit.

Par contre, ceux obtenus dans la Figure 22 nous montrent que le composé activé à la lumière en présence d'ions phosphate a une demi-vie indépendante de la quantité d'ions magnésium, celle-ci reste constante, pour les trois concentrations en chlorure de magnésium.

Le phosphate a donc un rôle important puisque sa présence rend constante la durée de vie du composé activé.

Cette constance de la durée de vie de ce composé activé à la lumière en présence d'ions phosphate tend à démontrer :
1) qu'il est <u>seul formé</u> dans ces conditions et
2) qu'il est <u>différent de celui formé à la lumière, mais en l'absence d'ions phosphate : X_e</u>, et dont la durée de vie varie avec la concentration en ions magnésium.

<u>Ce composé, que nous appelons dorénavant $X \sim P$</u> a une durée de vie plus grande que X_e , en présence de fortes concentrations en chlorure de magnésium, et indépendante de leur concentration

Conclusion.

Les résultats que nous venons d'exposer nous amènent à la conclusion suivante : la synthèse d'ATP chez les chloroplastes isolés peut dépendre de trois composés différents : X_e , X_e' et X~P.

Il n'est pas impossible que la formation de X~P soit précédée par celle de X_e ou X_e' . Mais nos résultats montrent un comportement différent de X~P par rapport à X_e et X_e' .

1. Nous pensons que les sites où se forment X_e à la lumière et X_e' à l'obscurité, sont différents. Les arguments en faveur de cette hypothèse sont :

a) le comportement différent de X_e et de X_e' vis a vis d'une action prolongée du tampon acide, c'est à dire des protons.:En effet la formation de X_e est inhibée après un séjour dans le milieu à pH 4,6, supérieur à 2 minutes (Fig. II, courbe 1, pg.50). Après 10 minutes de séjour à ce pH et à la lumière, les grana ne sont capables de synthétiser que la quantité d'ATP obtenue par variation de pH à l'obscurité (X_e'). Par contre X_e' augmente avec le temps de séjour dans le milieu à pH 4,6 (Fig. 11, courbe 3), pour rester constante entre 2 et 10 minutes d'action du tampon à pH 4,6. La limite atteinte par X_e et X_e' est la même. Après 10 minutes d'action du tampon acide il y a autant d'ATP synthétisé que les chloroplastes aient ou non été éclairés dans le milieu I, acide. Ceci veut dire qu'après ce temps X_e est totalement détruit et seul reste X_e'.

b) la différence de comportement de X_e vis à vis de l'action des protons chez les chloroplastes cassés (ou grana) et chez les chloroplastes entiers (courbes 1 des Fig. 12 et 13). En effet 10 min. de séjour des chloroplastes "entiers" dans le tampon acide n'a pas d'effet sur la formation de X_e (courbe 1, Fig. 13). Autant d'ATP est synthétisé après 10 min. d'action du tampon acide qu'après 1 min. Les protons en excès n'ont pas eu accès aux sites où se forme X_e et n'ont pu les détruire. Ceux-ci étant très probablement protégés par les protéines du stroma qui forment écran. Au contraire, les sites de X_e' sont accessibles aux protons chez les chloroplastes"entiers". En effet la synthèse d'ATP obtenue par variation de pH (X_e')(courbe 2, Fig. 13) augmente en fonction du temps de séjour dans le milieu I, acide. Les courbes : 2, Fig. 11 et 2 Fig. 13 sont parallèles.

c) La différence de comportement de X_e et X'_e vis à vis des ions orthophosphates présents dans le milieu I . Les courbes type B des Fig. 16 et 17 nous montrent une inhibition de la synthèse d'ATP lorsque les ions orthophosphate atteignent une certaine concentration. Les sites où se forme X_e sont inhibés par des concentrations élevées en phosphate. Au contraire la courbe, type B, de la Fig. 18 ne montre pas d'inhibition par les mêmes concentrations en ions orthophosphates. Les sites où se forme X'_e ne sont pas inhibés par les fortes concentrations en ions orthophosphates.

Ces observations nous font conclure à des sites différents dans le chloroplaste, pour la formation de X_e et de X'_e .

2. Les résultats exposés dans ce chapitre nous font conclure à la formation, dans certaines conditions, à la lumière d'un composé phosphorylé, $X \sim P$, précurseur de la synthèse de l'ATP.

Ces résultats se divisent en deux catégories : ceux obtenus en présence de faibles concentrations en ions orthophosphate, et ceux obtenus en présence de fortes concentrations en ions orthophosphate. A la première catégorie appartient le résultat exprimé au tableau I (p.58). La synthèse d'ATP est plus grande lorsque les ions orthophosphate ($^{31}P + {}^{32}P$)sont présents pendant la phase lumineuse (ATP_B), que lorsqu'ils sont présents pendant la phase obscure (ATP_J). Elle est aussi plus grande que dans le cas où l'on ajoute seulement les ions orthophosphate froids (^{31}P) pendant la phase lumineuse, et les ions orthophosphate radioactifs (^{32}P) pendant la phase obscure (ATP_C).

Nous concluons $(ATP)_B - \left\{(ATP)_C + (ATP)_A\right\} = X \sim P$

A la deuxième catégorie appartiennent les résultats obtenus lorsque les chloroplastes sont éclairés en présence de fortes concentrations en ions orthophosphates, et en présence de fortes quantités d'ions magnésium.

Premièrement: la synthèse de pyrophosphate que nous observons à pH 6, avec des chloroplastes éclairés.

Ce résultat montre que l'ion phosphate peut être activé à pH 6 et réagir avec une molécule de phosphate voisine, pour aboutir à la synthèse de pyrophosphate.

Deuxièmement ; la différence des demi-vies des composés activés formés à pH 6 à la lumière, en présence et en absence d'ions orthophosphates (Fig. 20). La demi-vie du composé formé en présence d'ions orthophosphates est supérieure à celle du composé formé en absence d'ions orthophosphates : $t_{1/2\,B} > t_{1/2\,J}$.

Cette différence observée conduit à penser à la formation de deux intermédiaires activés par la lumière, l'un contenant une molécule de phosphate $(X\sim P)$, l'autre n'en contenant pas (X_e).

Troisièmement : la stabilité du composé activé à la lumière en présence d'ions orthophosphates, vis à vis d'une variation de la concentration en ions magnésium et l'instabilité de celui activé à la lumière en absence d'ions orthophosphates.

En effet les Fig. 22 et 21 montrent que les demi-vies du composé formé dans les réactions du type B restent constantes, lorsque la concentration en ions magnésium varie entre 10^{-2} et 10^{-1}M. Au contraire, les demi-vies du composé formé dans les réactions du type J diminuent lorsque la concentration en ions magnésium croit.

Nous pensons que la formation de $X\sim P$ dépend de la présence d'une quantité suffisante d'ions magnésium pour les raisons suivantes :

- l'inhibition de la synthèse d'ATP par les fortes concentrations en ions orthophosphate est levée par l'augmentation de la concentration en ions magnésium, comme il apparait en comparant les courbes du type B des Fig. 16 et 17 avec la courbe ATP de la Fig. 19.
- la quantité d'ATP augmente , lors des phosphorylations du type B, en même temps que la concentration en ions magnésium, mais elle diminue lors des phosphorylations du type J lorsque la concentration en ions magnésium croit : voir tableau II et III, pg 71 .
- la synthèse de pyrophosphate, observée seulement lorsque la concentration en ions magnesium est élevée (10^{-1}M) dans le milieu I.

La formation de X_e est par contre inhibée par les ions magnésium (tableau III) et sa demi-vie diminuée.

Cette observation est parallèle aux résultats obtenus avec le $\triangle$pH.

En effet, le tableau IV nous montre une diminution du nombre de protons fixés, lorsque la concentration du milieu en ions magnésium croit. La demi-vie du $\triangle$pH diminue en même temps.

Mais à force ionique constante (Tableau V), le nombre de protons fixésreste constant, alors que la demi-vie du $\triangle$pH diminue lorsque la concentration en ion magnésium augmente.

L'effet inhibiteur des ions magnésium sur la formation de X_e et l'apparition du $\triangle$pH est en faveur d'une compétition entre les protons et les ions magnésium vis à vis d'un composé chargé négativement, et dont la formation est la conséquence de l'action de la lumière. Nous le schématisons comme suit :

$$\text{chloroplaste} + h\nu \longrightarrow R^-$$

$$R^- \xrightarrow{H^+} RH$$

$$R^- \xrightarrow{Mg^{++}} R\,Mg^+$$

Le composé RH en présence du milieu II, alcalin, libérerait le proton et redeviendrait le composé primitif R^-, chargé négativement et capable d'activer l'ion orthophosphate.

Par contre, on peut penser que l'ion orthophosphate s'associe déjà à la lumière au complexe $R\text{-}Mg^+$. Le nouveau complexe phosphorylé formé $R\text{-}Mg\sim P$, prédominerait toutes les autres formes activées du chloroplaste à pH 6 et à la lumière. Ce serait la raison pour laquelle sa demi-vie serait indépendante de la concentration en ions magnésium du milieu.

A N N E X E I

CALCUL DE LA QUANTITE D'IONS PHOSPHATE LIBRES, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS MAGNESIUM DU MILIEU.

La présence des ions magnésium dans le milieu où se trouvent les chloroplastes influe sur le nombre d'ions PO_4 libres présents. Cette quantité x est fonction du pH du milieu et de la concentration en ions magnésium. Le calcul qui suit nous donne ses différentes valeurs aux pH indiqués et pour trois concentrations en Mg.

$$MgH\ PO_4 \overset{k_1}{\rightleftharpoons} Mg^{++} + H\ PO_4^{=} \qquad pk_1 = 1,88\ (50) \qquad k_1 = \frac{[Mg^{++}][H\ PO_4^{=}]}{[Mg\ H\ PO_4]}$$

$$H_2\ PO_4^{-} \overset{k_2}{\rightleftharpoons} H^+ + H\ PO_4^{=} \qquad pk_2 = 6,78 \qquad k_2 = \frac{[H^+][H\ PO_4^{=}]}{[H_2\ PO_4^{-}]}$$

Par ailleurs nous avons

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad pk = 14$$

$$Mg(OH)_2 \rightleftharpoons Mg^{++} + 2\ OH^- \qquad pk_3 = 11\ (51) \qquad k_3 = \frac{[Mg^{++}][OH^-]^2}{[Mg(OH)_2]}$$

La somme P des molécules de phosphate est représentée par trois termes :

$$P = [H_2\ PO_4^{-}] + [H\ PO_4^{=}] + [Mg\ H\ PO_4]$$

et celles des molécules de magnésium totale G :

$$G = [Mg^{++}] + [Mg\ H\ PO_4] + [Mg(OH)_2]$$

de là :

$$H\,PO_4^{=} = \frac{K_2[H_2\,PO_4^{-}]}{h} = \frac{K_1[Mg\,H\,PO_4]}{[Mg^{++}]} = K_1\,\frac{[P-x]}{G-[P-x]\left[\dfrac{1}{1+\dfrac{10^{-28}}{K_3 h^2}}\right]}$$

ou x = fraction ionisée du phosphate

ou $h = [H^+]$

$$\frac{10^{-14}}{h} = [OH^-]$$

$$[Mg^{++}]\,\frac{10^{-28}}{K_3\,h^2} = Mg(OH)_2$$

$$\text{d'où}\quad [H_2\,PO_4^{-}] = \frac{K_1}{K_2}\,h \cdot \frac{P-x}{G-P+x} \cdot \left(1+\frac{10^{-28}}{K_3\,h^2}\right)$$

$$\text{et}\quad [H\,PO_4^{=}] = K_1\,\frac{P-x}{G-P+x} \cdot \left(1+\frac{10^{-28}}{K_3\,h^2}\right)$$

$$x =, [H_2\,PO_4^{-}] + [H\,PO_4^{=}] = \underbrace{K_1\,\left(1+\frac{h}{K_2}\right)\left(1+\frac{10^{-28}}{K_3\,h^2}\right)}_{f}\left(\frac{P-x}{G-P+x}\right)$$

$$x = f\left(\frac{P-x}{G-P+x}\right) \quad \text{et} \quad f = K_1\left(1+\frac{h}{K_2}\right)\left(1+\frac{10^{-28}}{K_3\,h^2}\right)$$

d'où

$$x^2 + (G - P + f)\,x - fP = 0$$

$$x = \sqrt{\left(\frac{G - P - f}{2}\right)^2 + fP} - \left(\frac{G - P + f}{2}\right)$$

avec $K_1 \approx 1{,}32.10^{-2}$

$K_2 \approx 1{,}66.10^{-7}$

$K_3 \approx 10^{-11}$

On a

pH	6	8
f	$9{,}3.10^{-2}$	$1{,}5.10^{-2}$

soit : $\frac{x}{P} = \lambda$; $\frac{G}{P} = \alpha$; $\frac{r}{P} = \beta$

$$\lambda = \frac{1}{2}(1 - \alpha - \beta) + \sqrt{\frac{1}{4}(1 - \alpha - \beta)^2 + \beta}$$

Nous indiquons, ci-dessous, le tableau donnant les calculs des concentrations d'ions phosphate (λ) dans les milieux à pH 6 et à pH 8 pour trois concentrations en chlorure de magnésium et sept concentrations en phosphate (le volume du milieu I est de 1 ml).

pH 6 $h = 10^{-6}$ $f = 1{,}32.10^{-2}\left(1 + \frac{10^{-6}}{1{,}66.10^{-7}}\right)\left(1 + \frac{10^{-28}}{10^{-11}.10^{-12}}\right)$

$$\underline{f = 9{,}266.10^{-2}}$$

TABLEAU I - ANNEXE I Calcul des ions phosphate libre dans le milieu I à pH 6

P	$0,5.10^{-2}$			10^{-2}			2.10^{-2}		
$\beta = \frac{f}{P}$	18,532			9,266			4.633		
G	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}
$\alpha = \frac{G}{P}$	2	10	20	1	5	10	0,5	2,5	5
$\alpha + \beta$	20.532	28.532	38.532	10.266	14.266	19.266	5.133	7.133	9.633
$1-(\alpha + \beta)$	-19.532	-27.532	-37.532	- 9.266	-13.266	-18.266	-4.133	-6.133	-8.633
$\frac{1-(\alpha + \beta)}{2}$	- 9.766	-13.766	-18.766	- 4.633	- 6.633	- 9.133	-20.665	-3.066	-4.316
$\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2$	95,35	189,6	352, 2	21,47	44,00	83,40	4,27	9,40	18,62
$\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2 + \beta$	113,88	208,13	370,73	30,73	53,27	92,66	8,90	14,03	23,25
$\sqrt{\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2 + \beta}$	10,67	14,43	19,25	5,545	7,299	9,62	2,986	3,746	4,822
λ	0,91	0,67	0,49	0,91	0,67	0,49	0,92	0,68	0,51
λP	$0,455.10^{-2}$	$0,335.10^{-2}$	$0,245.10^{-2}$	$0,91.10^{-2}$	$0,67.10^{-2}$	$0,49.10^{-2}$	$1,84.10^{-2}$	$1,36.10^{-2}$	$1,02.10^{-2}$

5.10^{-2}			10^{-1}			$1,5.10^{-1}$			2.10^{-1}		
1.853			0,927			0,618			0,463		
10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}
0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,066	0,333	0,666	0,05	0,25	0,5
2.053	2.853	3.853	1.027	1.427	1.927	0,684	0,951	1,284	0,513	0,713	0,963
-1.053	-1.853	-2.853	-0,027	-0,427	-0,927	0,316	0,049	-0,284	0,487	0,287	0,037
-0,526	-0,926	-1,426	-0,013	-0,213	-0,463	0,158	0,024	-0,142	0,243	0,143	0,018
0,277	0,856	2,032	0,00017	0,0459	0,214	0,0249	0,0058	0,0215	0,059	0,020	0,00032
2,130	2,709	3,885	0,927	0,972	1,141	0,643	0,624	0,639	0,522	0,483	0,463
1,46	1,646	1,97	0,963	0,986	1,068	0,803	0,790	0,800	0,723	0,695	0,68
0,94	0,72	0,55	0,95	0,77	0,60	0,96	0,82	0,66	0,97	0,84	0,70
$4,7.10^{-2}$	$3,6.10^{-2}$	$2,75.10^{-2}$	$9,5.10^{-2}$	$7,7.10^{-2}$	6.10^{-2}	$14,4.10^{-2}$	$12,3.10^{-2}$	$9,9.10^{-2}$	$19,4.10^{-2}$	$16,8.10^{-2}$	$14,0.10^{-2}$

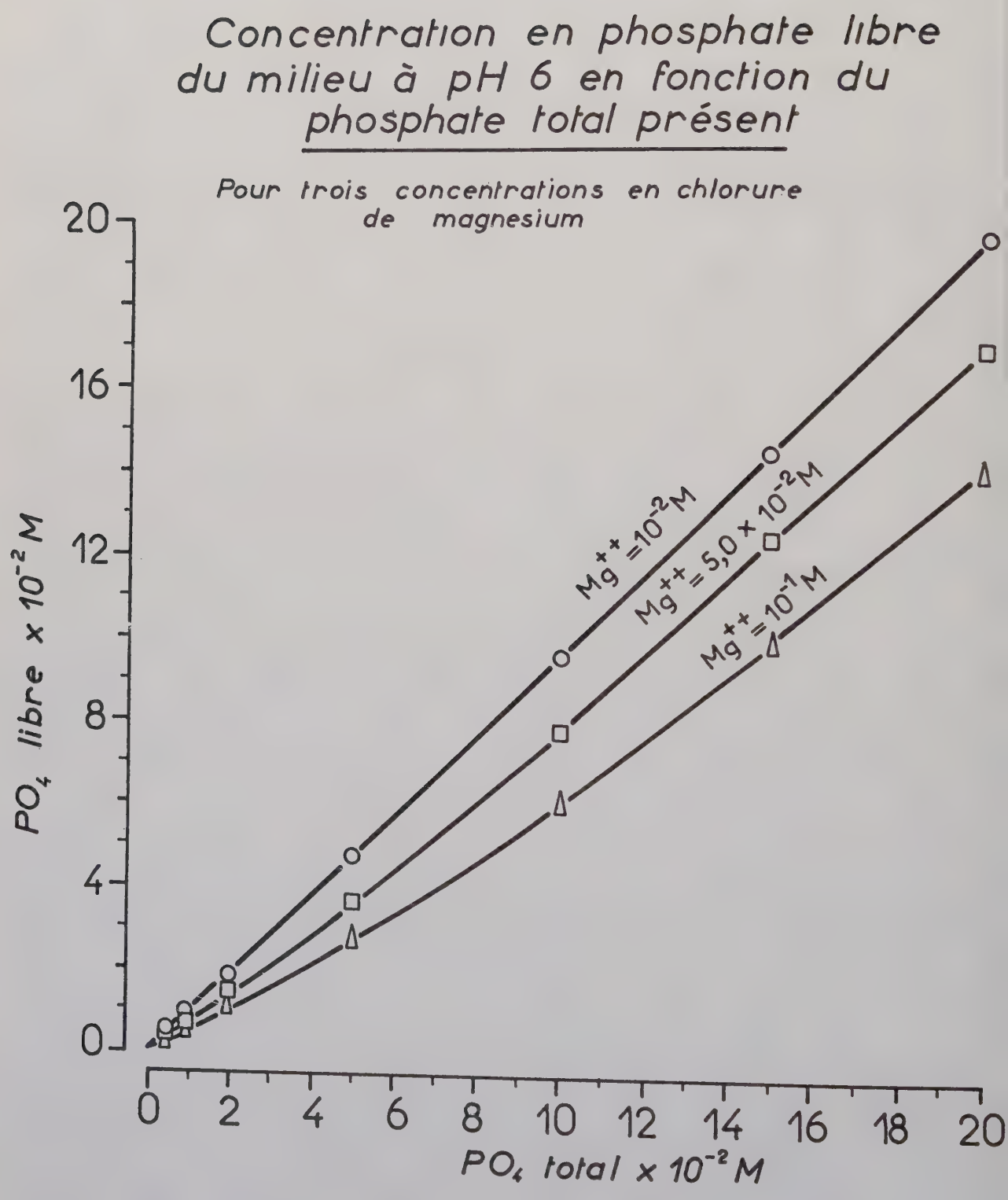


Fig.1, Annexe I

A pH 8 $\underline{h = 10^{-8}}$

$$f = 1{,}32.10^{-2} \left(1 + \frac{10^{-8}}{1{,}66.10^{-7}}\right) \left(1 + \frac{10^{-28}}{10^{-11}.10^{-16}}\right)$$

$$\underline{f = 1{,}54.10^{-2}}$$

(Le volume du milieu II final est de 2 ml).

TABLEAU II - ANNEXE I Calcul des ions phosphate libre dans le milieu II à pH 8

P	$0,25.10^{-2}$			$0,5.10^{-2}$			10^{-2}		
$\beta = \frac{f}{P}$	6,160			3,08			1,54		
G	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}
$\alpha = \frac{G}{P}$	2	10	20	1	5	10	0,5	2,5	5
$\alpha + \beta$	8,160	16,160	26,160	4,08	8,08	13,08	2,04	4,04	6,54
$1-(\alpha+\beta)$	-7,160	-15,160	-25,160	-3,08	-7,08	-12,08	-1,04	-3,04	-5,54
$\frac{1-(\alpha+\beta)}{2}$	-3,58	- 7,58	-12,58	-1,54	-3,54	- 6,04	-0,52	-1,52	-2,77
$\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2$	12,85	57,4	15,8	2,375	12,55	36,5	0,257	2,31	7,68
$\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2 + \beta$	19,01	63,56	164,16	5,455	15,63	39,58	1,797	3,85	9,22
$\sqrt{\left(\frac{1-\alpha-\beta}{2}\right)^2 + \beta}$	4,37	7,97	12,82	2,335	3,955	6,29	1,34	1,962	3,035
λ	0,79	0,39	0,24	0,79	0,41	0,25	0,82	0,44	0,26
λP	$0,199.10^{-2}$	$0,097.10^{-2}$	$0,06.10^{-2}$	$0,395.10^{-2}$	$0,205.10^{-2}$	$0,125.10^{-2}$	$0,82.10^{-2}$	$0,44.10^{-2}$	$0,26.10^{-2}$

$2,5.10^{-2}$			5.10^{-2}			$7,5.10^{-2}$			10^{-1}		
0,616			0,308			0,205			0,154		
$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}
0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,066	0,333	0,666	0,05	0,25	0,5
0,816	1.616	2.616	0,408	0,808	1,308	0,271	0,538	0,871	0,204	0,404	0,654
0,184	-0,616	-1,616	0,592	0,192	-0,308	0,729	0,462	0,129	0,796	0,594	0,346
0,092	-0,308	-0,808	0,296	0,096	-0,154	0,364	0,231	0,064	0,398	0,297	0,173
0,0084	0,095	0,653	0,0877	0,0092	0,0237	0,1325	0,0534	0,0041	0,1585	0,0882	0,030
0,6244	0,711	1,269	0,3957	0,3172	0,3317	0,3375	0,2584	0,2091	0,3125	0,2422	0,184
0,79	0,844	1,128	0,629	0,563	0,576	0,581	0,508	0,457	0,559	0,492	0,429
0,88	0,53	0,32	0,92	0,66	0,42	0,94	0,74	0,52	0,95	0,79	0,60
$2,2.10^{-2}$	$1.32.10^{-2}$	$0,8.10^{-2}$	$4,6.10^{-2}$	$3,3.10^{-2}$	$2,1.10^{-2}$	$7,05.10^{-2}$	$5,55.10^{-2}$	$3,9.10^{-2}$	$9,5.10^{-2}$	$7,9.10^{-2}$	$6,0.10^{-2}$

Concentration en phosphate libre du milieu à pH 8 en fonction du phosphate total présent

(Pour trois concentrations en chlorure) de magnésium

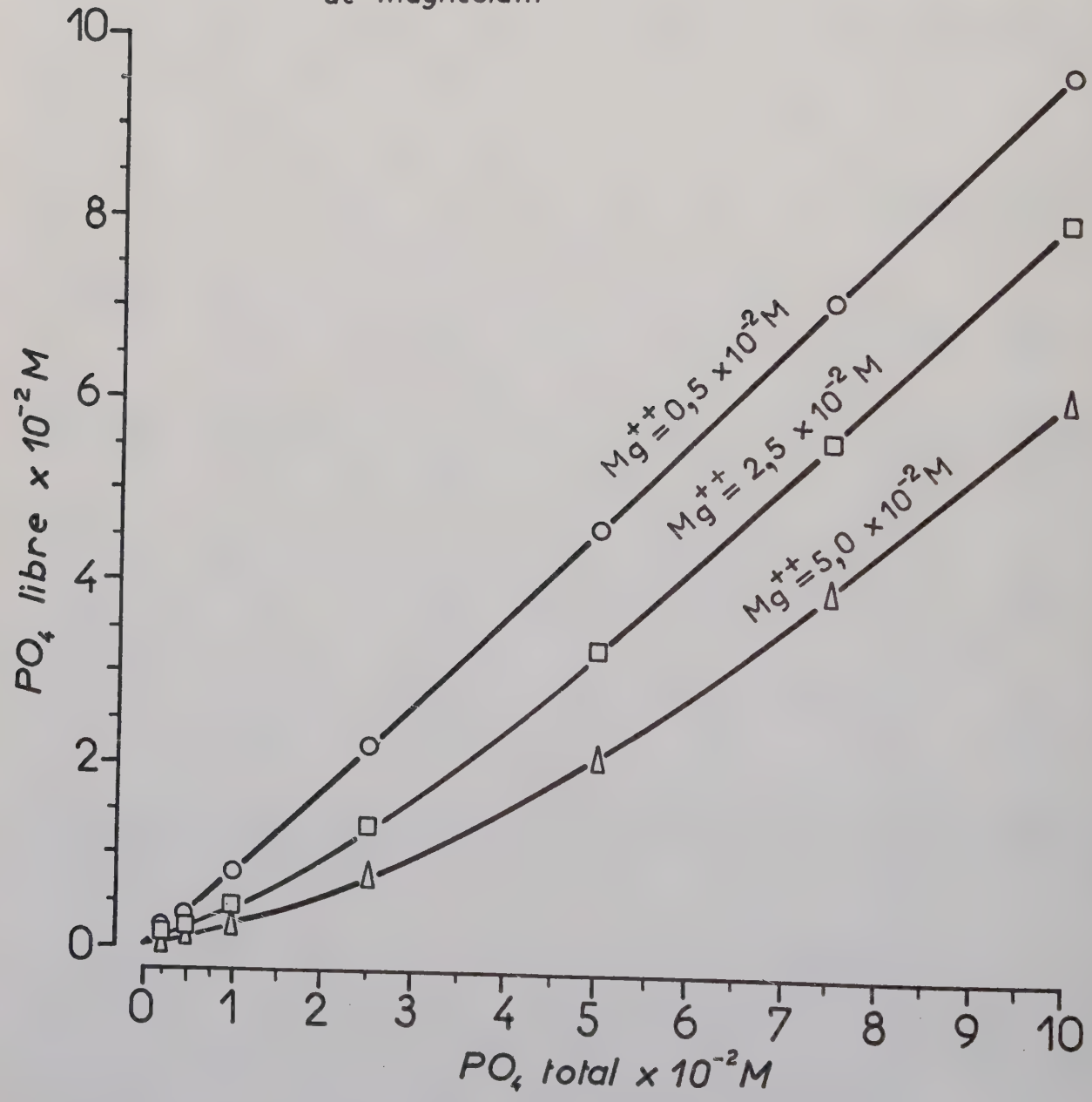


Fig. 2 , Annexe I .

CALCUL DE LA QUANTITE D'IONS MAGNESIUM LIBRES, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ORTHOPHOSPHATE DU MILIEU.

Après avoir calculé les quantités de phosphate libre présent dans le milieu pour sept concentrations en phosphate et trois en magnésium, nous calculons les quantités de magnésium présent sous forme d'ions Mg^{++} libre et non pas liés sous forme de phosphate de magnésium, pour ces mêmes concentrations en phosphate et en chlorure de magnésium.

Ce calcul est fait pour les pH 6 et 8.

$$H_2PO_4^- \overset{K_2}{\rightleftharpoons} H PO_4^= + H^+ \qquad \text{avec } K_2 \simeq 1{,}66.10^{-7}$$

et

$$K_2 = \frac{[H PO_4^=]\,[H^+]}{[H_2 PO_4^-]}$$

A pH 6 on a :

$$[H_2 PO_4^-] = \frac{10^{-6}}{1{,}66.10^{-7}} \cdot [H PO_4^=]$$

$$[H_2 PO_4^-] = 6\ [H PO_4^=]$$

$$(1) \quad [H_2 PO_4^-] - 6\ [H PO_4^=] = 0$$

et

$$(2) \quad [H_2 PO_4^-] + [H PO_4^=] = \lambda P$$

avec λ = fraction de phosphate libre

et P = phosphate total

d'ou en soustrayant (1) de (2) on obtient :

$$7\ [H PO_4^=] = \lambda P$$

$$[H PO_4^=] = \frac{\lambda P}{7}$$

Considérons maintenant l'équation

$$Mg\ H\ PO_4 \overset{K_1}{\rightleftharpoons} Mg^{++} + HPO_4^{=} \qquad \text{avec } K_1 \approx 1{,}32.10^{-2} \text{ et } K_3 = 10^{-11}$$

$$K_1 = \frac{[Mg^{++}]\,[H\ PO_4^{=}]}{[Mg\ H\ PO_4]} \qquad K_3 = \frac{(Mg^{++})(OH^-)^2}{[Mg(OH)_2]}$$

$$G = Mg\ H\ PO_4 + Mg^{++} + Mg(OH)_2$$

De là :

$$Mg^{++} = \frac{G}{1 + \frac{\lambda P}{7\ K_1} + \frac{10^{-16}}{K_3}} \qquad \text{posons : } \frac{Mg^{++}}{G} = \mu$$

$$\mu = \frac{1}{1 + \frac{\lambda P}{7\ K_1} + 10^{-5}}$$ (nous négligeans la valeur de 10^{-5})

$$\mu = \frac{1}{1 + 10{,}8\ \lambda P} \qquad \text{et} \quad Mg^{++} = \mu G$$

TABLEAU III - ANNEXE I Calcul de Mg^{++} libre dans le milieu I à pH 6.

pH 6

P	$0,5.10^{-2}$			10^{-2}			2.10^{-2}		
G	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}
λ	0,91	0,67	0,49	0,91	0,67	0,49	0,92	0,68	0,51
λ P	$0,455.10^{-2}$	$0,335.10^{-2}$	$0,245.10^{-2}$	$0,91.10^{-2}$	$0,67.10^{-2}$	$0,49.10^{-2}$	$1,84.10^{-2}$	$1,36.10^{-2}$	$1,02.10^{-2}$
10,8 λ P	$4,92.10^{-2}$	$3,61.10^{-2}$	$2,64.10^{-2}$	$9,82.10^{-2}$	$7,23.10^{-2}$	$5,29.10^{-2}$	$19,85.10^{-2}$	$14,68.10^{-2}$	$11,02.10^{-2}$
1 + 10,8 λP	1,0492	1,036	1,0264	1,098	1,072	1,0529	1,1985	1,1468	1,1102
μ	0,95	0,96	0,97	0,91	0,93	0,95	0,83	0,87	0,90
μG	$0,95.10^{-2}$	$4,8.10^{-2}$	$9,7.10^{-2}$	$0,91.10^{-2}$	$4.60.10^{-2}$	$9,5.10^{-2}$	$0,83.10^{-2}$	$4,35.10^{-2}$	9.10^{-2}

5.10^{-2}			10^{-1}			$1,5.10^{-1}$			2.10^{-1}		
10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	5.10^{-2}	10^{-1}
0,94	0,72	0,55	0,95	0,77	0,60	0,96	0,82	0,66	0,97	0,84	0,70
$4,07.10^{-2}$	$3,6.10^{-2}$	$2,75.10^{-2}$	$9,5.10^{-2}$	$7,7.10^{-2}$	6.10^{-2}	$14,4.10^{-2}$	$12,3.10^{-2}$	$9,9.10^{-2}$	194.10^{-2}	$16,8.10^{-2}$	14.10^{-2}
$50,8.10^{-2}$	$40,10^{-2}$	$29,7.10^{-2}$	$102,5.10^{-2}$	$83,2.10^{-2}$	$64.8.10^{-2}$	$155,5.10^{-2}$	133.10^{-2}	107.10^{-2}	209.10^{-2}	1815.10^{-2}	1505.10^{-2}
1,508	1,40	1,297	2,025	1,83	1,648	2,555	2,33	2,07	3,09	2,81	2,505
0,66	0,71	0,77	0,49	0,54	0,60	0,39	0,43	0,48	0,32	0,35	0,40
$0,65.10^{-2}$	$3,6.10^{-2}$	$7,7.10^{-2}$	$0,49.10^{-2}$	$2,7.10^{-2}$	6.10^{-2}	$0,39.10^{-2}$	$2,15.10^{-2}$	$4,8.10^{-2}$	$0,32.10^{-2}$	$1,75.10^{-2}$	$4,0.10^{-2}$

Concentration en ions magnésium libre en fonction du phosphate total présent dans le milieu à pH 6

(Pour trois concentrations initiales en chlorure de magnésium)

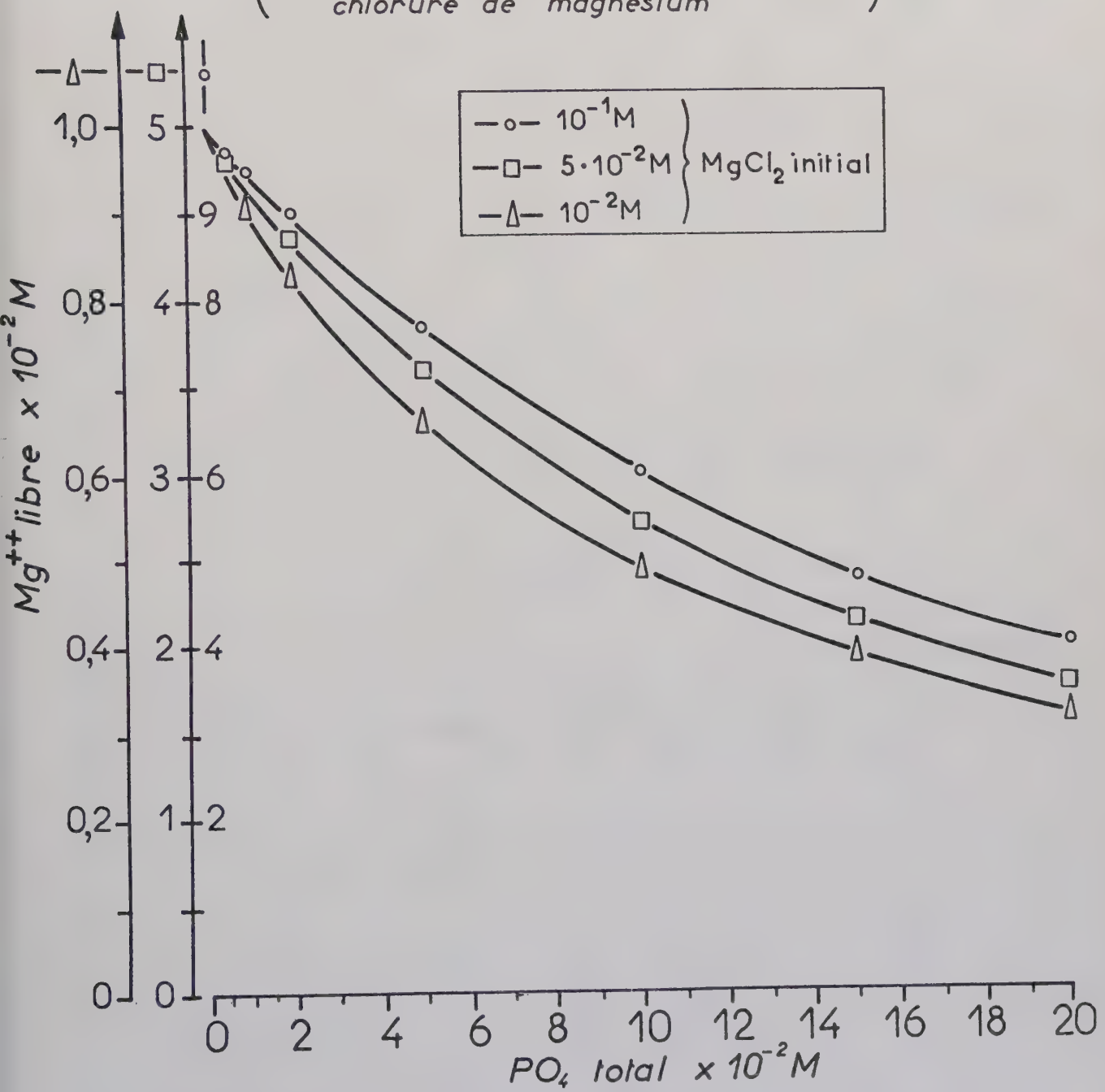


Fig. 3 , Annexe I .

A pH 8 les mêmes équations sont valables mais les valeurs vont changer :

$$H_2\,PO_4^- \overset{K_2}{\rightleftharpoons} H\,PO_4^{=} + H^+$$

$$K_2 = \frac{[H\,PO_4^{=}]\,[H^+]}{[H_2\,PO_4^-]}$$

$$[H_2\,PO_4^-] = \frac{10^{-8}}{1.66.10^{-7}}\,[H\,PO_4^{=}]$$

$$[H_2\,PO_4^-] - 6.10^{-2}\,[H\,PO_4^{=}] = 0$$

$$[H_2\,PO_4^-] + [H\,PO_4^{=}] = \lambda P$$

$$1,06\,[H\,PO_4^{=}] = \lambda P$$

$$[H\,PO_4^{=}] = \frac{\lambda P}{1,06}$$

et $G = Mg\,H\,PO_4 + Mg^{++} + Mg(OH)_2$

Remplaçons dans

$$K_1 = \frac{[Mg^{++}]\,[H\,PO_4^{=}]}{[Mg\,H\,PO_4]} \qquad \text{avec } K_1 \approx 1,32.10^{-2}$$

$$K_1\,[G - Mg^{++} - Mg(OH)_2] = (Mg^{++})\,\frac{\lambda P}{1,06}$$

$$\frac{Mg^{++}}{G} = \frac{1}{1 + \frac{\lambda P}{1,06\,K_1} + \frac{10^{-12}}{K_3}} \qquad \text{avec } K_3 \approx 10^{-11}$$

$$\mu = \frac{1}{1 + 71,5\,\lambda P + 10^{-1}} \qquad \mu = \frac{1}{1,1 + 71,5\,\lambda P}$$

TABLEAU IV - ANNEXE I Calcul de Mg^{++} libre dans le milieu II à pH 8

P	$0,25.10^{-2}$			$0,5.10^{-2}$			10^{-2}		
G	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}
λ	0,79	0,39	0,24	0,79	0,41	0,25	0,82	0,44	0,26
λ P	$0,199.10^{-2}$	$0,097.10^{-2}$	$0,06.10^{-2}$	$0,395.10^{-2}$	$0,205.10^{-2}$	$0,125.10^{-2}$	$0,82.10^{-2}$	$0,44.10^{-2}$	$0,26.10^{-2}$
71,5 P	0,142	0,069	0,043	0,276	0,146	0,0895	0,588	0,315	0,186
1,1 + 71,5 P	1,242	1,169	1,143	1,376	1,246	1,189	1,688	1,415	1,286
μ	0, 805	0,855	0,875	0,727	0,802	0,84	0,592	0,708	0,778
μG	$0,402.10^{-2}$	$2,14.10^{-2}$	$4,37.10^{-2}$	$0,363.10^{-2}$	$2,01.10^{-2}$	$4,2.10^{-2}$	$0,293.10^{-2}$	$1,77.10^{-2}$	$3,9.10^{-2}$

$2,5.10^{-2}$			5.10^{-2}			$7,5.10^{-2}$			10^{-1}		
$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}	$0,5.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	5.10^{-2}
0,88	0,53	0,32	0,92	0,66	0,42	0,94	0,74	0,52	0,95	0,79	0,60
$2,2.10^{-2}$	$1,32.10^{-2}$	$0,8.10^{-2}$	$4,6.10^{-2}$	$3,3.10^{-2}$	$2,1.10^{-2}$	$7,05.10^{-2}$	$5,55.10^{-2}$	$3,9.10^{-2}$	$9,5.10^{-2}$	$7,9.10^{-2}$	$6,0.10^{-2}$
1,57	0,945	0,572	3,28	2,36	1,5	5,04	3,97	2,79	6,8	5,65	4,29
2,67	2,045	1,672	4,38	3,46	2,6	6,14	5,07	3,89	7,9	6,75	5,39
0,375	0,49	0,60	0,228	0,29	0,385	0,163	0,198	0,257	0,126	0,148	0,186
$0,188.10^{-2}$	$1,225.10^{-2}$	$3,0.10^{-2}$	$0,114.10^{-2}$	$0,726.10^{-2}$	$1,92.10^{-2}$	$0,081.10^{-2}$	$0,49.10^{-2}$	$1,28.10^{-2}$	$0,063.10^{-2}$	$0,37.10^{-2}$	$0,93.10^{-2}$

Concentration en ions magnesium libre en fonction du phosphate total présent dans le milieu à pH 8

(Pour trois concentrations en chlorure de magnésium)

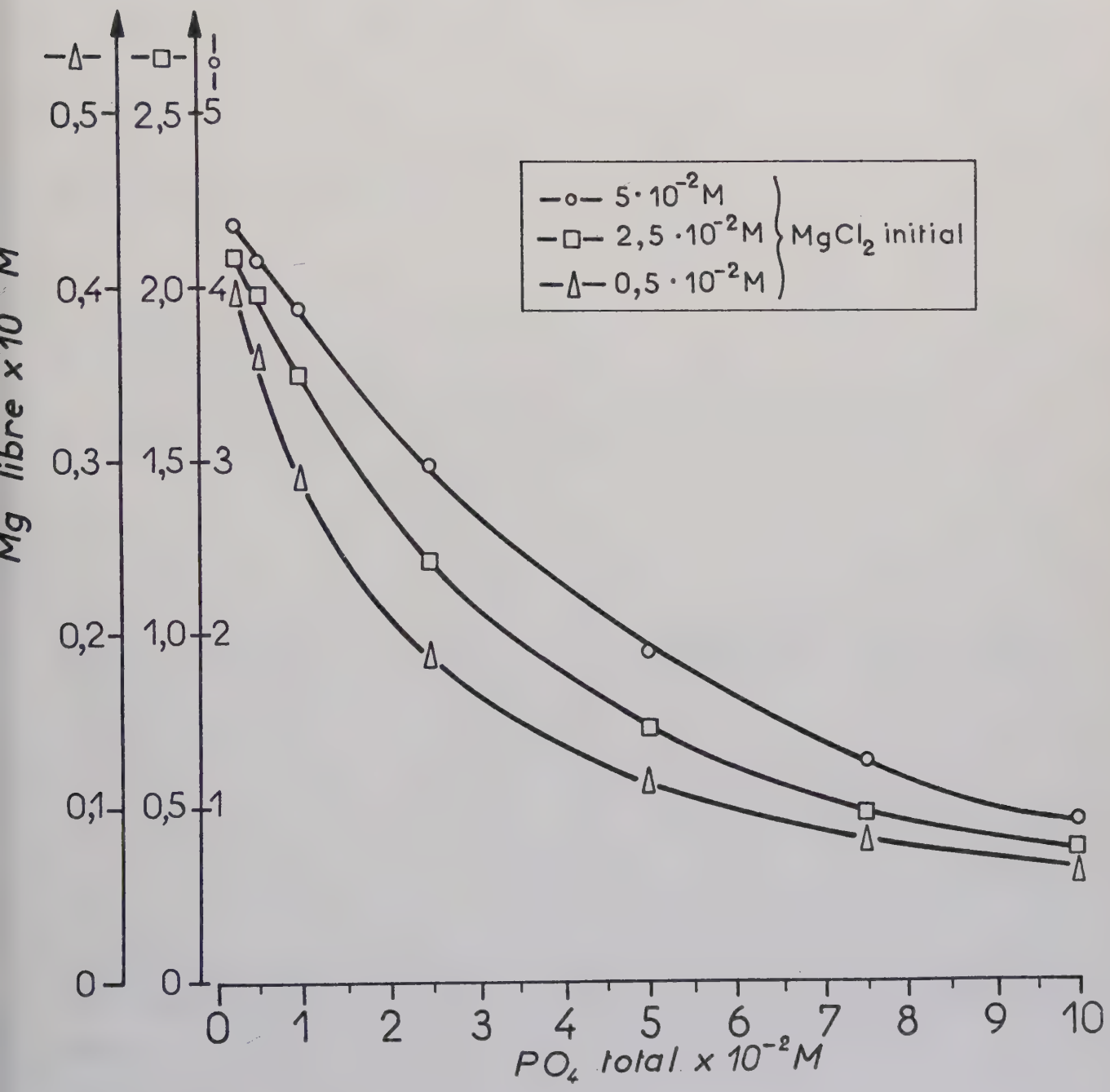
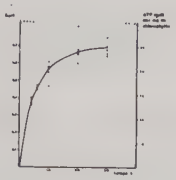


Fig. 4 , Annexe I .

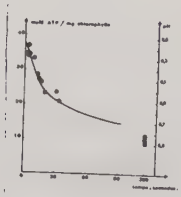
PARALLELISME ENTRE L'APPARITION DU pH ET CELLE DE X_e.

A. En fonction du temps :
d'éclairement

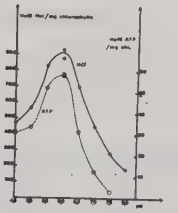
pH et ATP = f(temps hν)



pH et ATP = f(temps d'obscurité)



B. En fonction du pH initial :

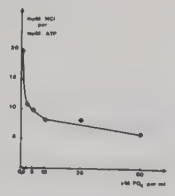


C. H^+/ATP :

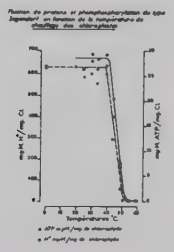
a) fonction du pH initial : H^+/ATP = cte

b) " de λ (6500, 7000, 7200 Å) : H^+/ATP = cte

c) " de la concentration en phosphate : H^+/ATP



D. En fonction de la température de préchauffage des chloroplastes.



Conclusion.

Existence d'un parallélisme et d'une relation stoechiométrique entre la quantité de protons fixés et celle de X_e formé .

V. EXPOSE DES RESULTATS RELATIFS AU PARALLELISME ENTRE LA VARIATION DE pH INDUITE PAR UN ECLAIREMENT ET LA FORMATION DE X_e.

Introduction.

Les premières études faites en 1964 par Neumann et Jagendorf (40) sur les variations de pH induites par un éclairement d'une suspension de chloroplastes, fait apparaitre une similitude entre le phénomène étudié et l'apparition de X_e.

Elles montrent que les mêmes médiateurs électrochimiques favorisent les deux phénomènes (pyocyanine, FMN, vitamine K_5, ferricyanure); que le pH optimum se situe entre 6 et 6,5 autant pour la formation de X_e que pour la variation de pH; que les cinétiques d'apparition à la lumière et de disparition à l'obscurité sont semblables.

L'étude de l'effet de quelques découplants (EDTA, mCl-CCP, atebrin NH_4Cl) des photophosphorylations, sur la formation de X_e, montre qu'ils ont un effet inhibiteur aussi bien sur la formation de X_e que sur la variation de pH (Δ pH).

Citons encore les travaux de Rumberg (52) mesurant la translocation des protons et la synthèse d'ATP sur une même suspension de chloroplastes soumise à de nombreux éclairs successifs.

Mac Carty (53) étudie l'inhibition par le chlorure d'amonium de l'apparition de X_e, de la variation de pH et des photophosphorylations sur des chloroplastes entiers et fractionnés par ultra-sons. Il observe une inhibition de l'apparition de X_e et de la variation de pH chez les deux catégories de chloroplastes. Mais il observe une inhibition des photophosphorylations chez les chloroplastes entiers et pas d'inhibition chez les chloroplastes fractionnés.

Nishimura (54) étudie la formation de X_e et la variation de pH aved les chromatophores de Rhodospirilum Rubrum.

Tous ces auteurs ont cherché à établir un parallélisme entre la variation de pH et l'apparition du pouvoir phosphorylant : X_e consécutivement à un éclairement. Mais excepté Rumberg et coll. tous ces auteurs ont étudié ces deux phénomènes sur des suspensions de chloroplastes différentes.

Dans le travail exposé dans ce chapitre V, nous nous attachons à montrer le parallélisme entre la variation du pH consécutive à un éclairement et l'apparition de X_e, mais sur une même suspension de chloroplastes.

Note : Nous exprimons la variation de pH, par le nombre de protons fixés par les chloroplastes. Mais il faut préciser qu'aucune preuve n'a été apportée d'une réelle fixation de protons. Nous observons simplement une alcalinisation de la suspension de chloroplastes.

Pour étudier ce problème nous avons :

A) Comparé les cinétiques d'apparition et de disparition des deux phénomènes.

B) Comparé l'influence du pH initial de la suspension de chloroplastes.

C) Etudié le rapport H^+/ATP en fonction du pH initial de la suspension; de la longueur d'onde de la lumière incidente: et de la concentration en ions orthophosphate, ajoutés à l'obscurité au milieu II.

D) L'influence de la température à laquelle les chloroplastes sont portés.

L'estimation de X_e et les mesures de variation de pH se font sur la même suspension de chloroplastes placés dans l'enceinte refroidie et éclairée, comme le montre le schéma de la figure 9 du Chapitre III : Techniques et Méthodes.

RESULTATS

A) APPARITION ET DISPARITION DU $\triangle$pH ET DE X_e EN FONCTION DU TEMPS D'ECLAIREMENT ET D'OBSCURITE.

Les cinétiques d'apparition du $\triangle$pH et de X_e ont été suivies sur une même suspension de chloroplastes "cassés" [55] pendant un éclairement en lumière blanche.

Note : Dans toutes nos expériences nous évaluons les quantités de X_e formé à la lumière par les quantités d'ATP synthétisé, ensuite pendant l'étape se déroulant à l'obscurité.

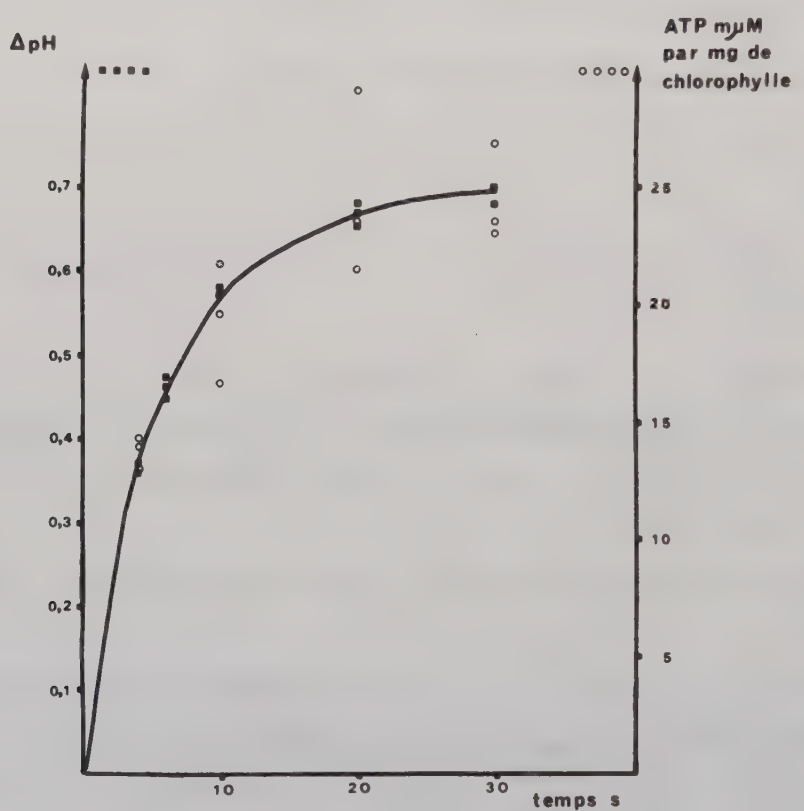


Fig. 23

La figure 23 représente la courbe donnant d'une part les quantités d'ATP synthétisé, d'autre part la variation du pH de la suspension en fonction du temps d'éclairement des chloroplastes.

Protocole expérimental :

3 ml de suspension de chloroplastes, contenant 500 µg de chlorophylle, 10 µM $MgCl_2$, 5.10^{-2} µM pyocyanine par ml sont agités et éclairés en lumière blanche. On enregistre la variation du pH avec le pHmètre Tacussel, relié à l'enregistreur Beckmann (voir Chapitre: Techniques et Méthodes p.30), pendant l'éclairement et aux temps correspondant à 5, 10, 20 et 30 secondes après le début de l'éclairement, on fait un prélèvement de chloroplastes avec une seringue obscurcie et contenant (milieu II) : 5 µM ADP, 5 µM $^{31}PO_4$, 10 µCi ^{32}P, 70 µM Tris-HCl à pH convenable pour amener la suspension à pH 8, dans 1 ml. On agite le mélange pendant 30 secondes et injecte dans 0,2 ml d'HCl 1 N.

Les cinétiques de disparition des deux phénomènes ont été suivies à l'obscurité après des temps variant de quelques secondes à quelques minutes après l'extinction de la lumière.

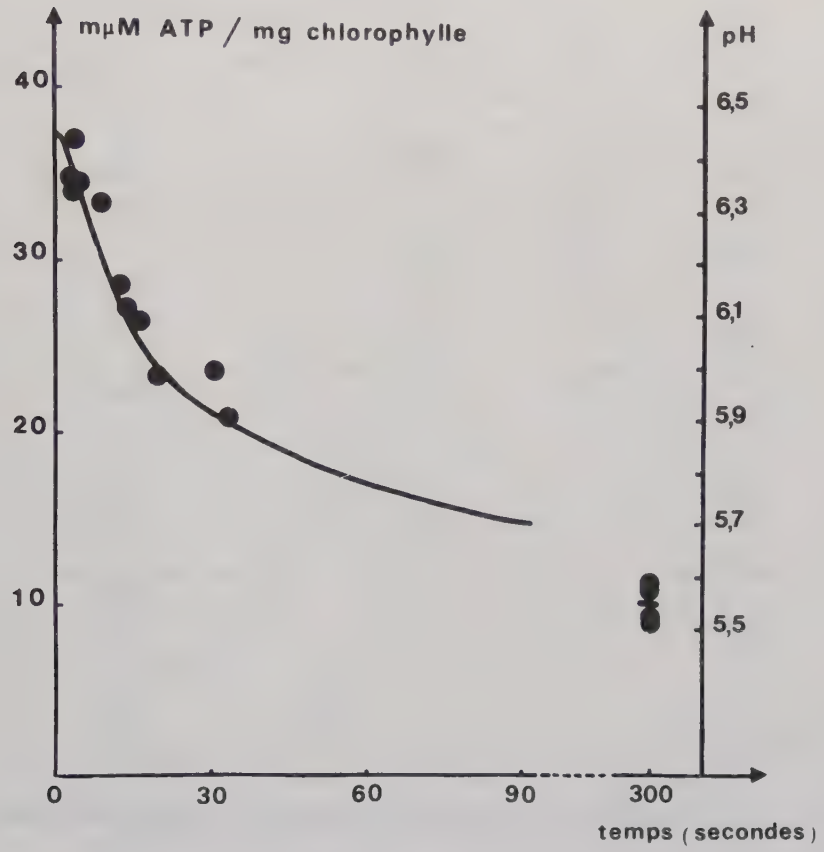


Fig. 24

La figure 24 représente d'une part la courbe d'enregistrement du pH de la suspension de chloroplastes après l'extinction de la lumière, d'autre part les points correspondant aux quantités d'ATP synthétisé, 5, 10, 15, 20, 30 et 300 secondes après la fin de l'éclairement.

Le protocole expérimental est le même que celui décrit avec la Fig.23.

Nous constatons à nouveau un parallélisme entre les deux phénomènes.

B) INFLUENCE DU pH INITIAL DE LA SUSPENSION DE CHLOROPLASTES SUR LE NOMBRE DE PROTONS FIXES ET LA QUANTITE DE X_E FORME

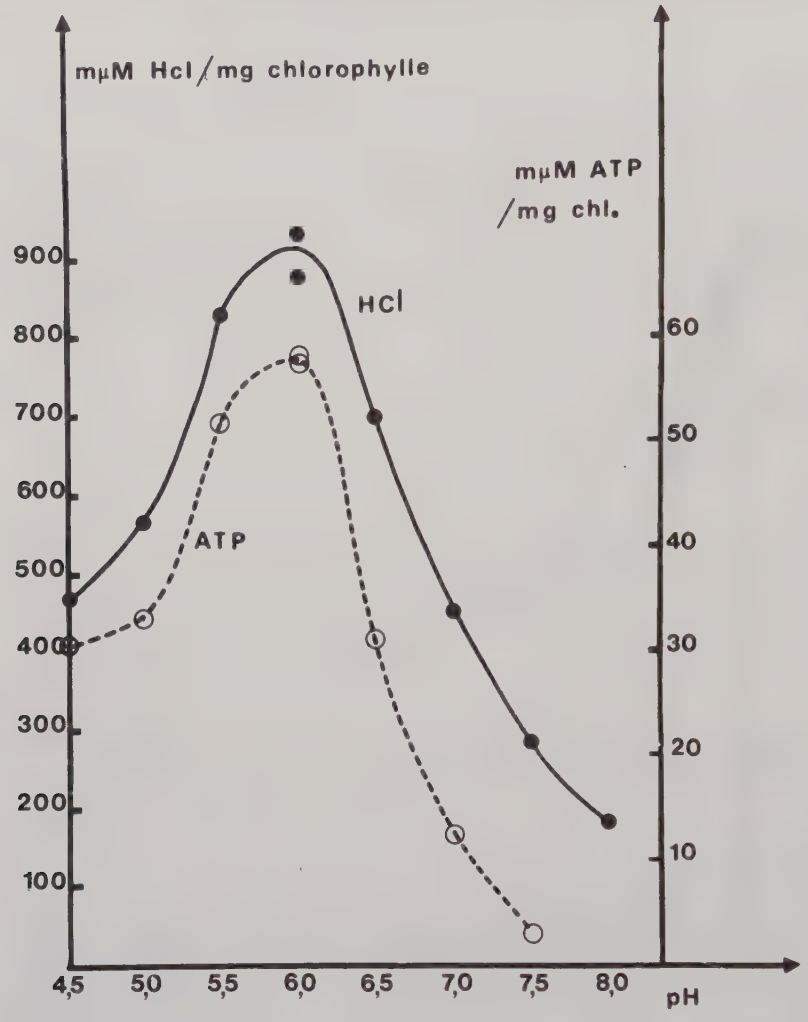


Fig. 25

La figure 25 représente les quantités d'ATP synthétisé et le nombre de protons fixés par les chloroplastes, en fonction du pH initial auquel les chloroplastes sont placés avant l'éclairement.

Le protocole expérimental et la composition des milieux sont les mêmes que ceux décrits avec la Fig. 23. La différence réside dans les valeurs du pH initial (variant de 4,5 à 8) que l'on obtient en ajoutant HCl 10^{-2}M ou NaOH 10^{-2}M. On maintient le pH au moyen du pH-stat : Autotitristop 2 (voir Chapitre : Techniques et Méthodes, p. 35). On éclaire jusqu'à nouvelle stabilisation du pH et effectue alors un prélèvement de la suspension de chloroplastes dans la seringue obscurcie contenant le milieu II.

Les deux courbes de la figure 25 présentent un maximum à pH 6. C'est le pH optimum pour les deux phénomènes. Il faut noter que les quantités d'ATP synthétisé au-delà de pH 6,5 ne sont que très approximatives puisque la durée de vie de X_e décroit très rapidement au-delà de ce pH et que nos techniques de prélèvement des chloroplastes sont relativement lentes.

C) RAPPORT H^+/ATP

L'étude de ce rapport présente un intérêt pour l'établissement des relations existant entre la fixation des protons et la formation de X_e.

La variation de ce rapport étudié en fonction d'un paramètre influençant les deux réactions doit nous renseigner sur la possibilité d'un déroulement en série, ou au contraire, sur l'absence de liaison directe entre ces deux évènements.

Deux types de schéma peuvent être imaginés :
le premier correspond à un déroulement des évènements en série mais avec deux possibilités, celle ou la formation de X_e précède la fixation des protons,

$$\text{chlorophylle} + h\nu \longrightarrow \text{chlorophylle}^* \longrightarrow X_e \longrightarrow \triangle pH$$

et celle où la formation de X_e suit la fixation des protons

$$\text{chlorophylle} + h\nu \longrightarrow \text{chlorophylle}^* \longrightarrow \triangle pH \longrightarrow X_e$$

Le deuxième type de schéma sera celui où les deux réactions sont indépendantes :

$$\text{chlorophylle} + h\nu \longrightarrow \text{chlorophylle}^* \begin{cases} \nearrow \triangle pH \\ \searrow X_e \end{cases}$$

(chlorophylle* = chlorophylle à l'état singlet excité).

Si le rapport H^+/ATP reste constant en fonction du paramètres étudié, il y a déroulement en série des deux réactions. Si au contraire, ce rapport est variable, les deux réactions sont indépendantes.

Nous étudierons le rapport H^+/ATP

a) en fonction du pH initial de la suspension de chloroplastes

b) en fonction de la longueur d'onde à laquelle les chloroplastes ont été éclairés

c) en fonction de la concentration en ions orthophosphate (présents dans le milieu II).

a) Rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction du pH initial de la suspension de chloroplastes

Le tableau VI présente les valeurs de ce rapport en fonction du pH de la suspension auquel les chloroplastes ont été amenés avant l'éclairement. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans la légende de la figure 25. Les résultats expriment d'une manière différente ceux présentés sur la figure 25. Les rapports $\frac{H^+}{ATP}$ ont été calculés sur 4 séries de manipulations différentes.

TABLEAU VI

Rapport de HCl ajouté à l'ATP synthétisé

pH / numéro de l'expérience	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
1	14,6	15,7	13,3	13,5	14,5
2	15,7	13,8	12,0	16,5	14,8
3	16,4	19,3	13,9	15,5	19,7
4	15,2	17,1	16,0	15,3	22,5
Valeur moyenne	15,5	16,5	13,8	15,2	17,9
σ^2	0,44	4,02	2,08	1,17	11,4

Valeur moyenne totale = 15,78

Test Snedecor [56] avec 10 % de tolérance : $0,17 < \frac{V_1}{V_2} < 3,06$

V_1 = première détermination de la variance = 9,35

V_2 = deuxième détermination de la variance = 5,1

$\frac{V_1}{V_2} = 1,84$

Nous constatons que les valeurs des rapports $\frac{H^+}{ATP}$ sont constantes pour les valeurs du pH initial de la suspension, comprises entre 4,5 et 6,5.

b) Rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction de la longueur d'onde à laquelle les chloroplastes sont éclairés.

On sait que les phosphorylations non accompagnées de dégagement d'oxygène, c'est à dire les phosphorylations cycliques, s'effectuant en présence d'un médiateur électrochimique, peuvent se dérouler en éclairant les chloroplastes avec une lumière de $\lambda > 7\ 000$ Å [57]. Les chloroplastes peuvent aussi fixer les protons lorsqu'ils sont éclairés avec une lumière incidente de longueur d'onde égale ou supérieure à 7 000 Å [58, 59].

Avant de mesurer le rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction de λ, nous avons évalué le taux de fixation des protons à deux longueurs d'onde : 6 500 Å et 7 000 Å en fonction de l'intensité de la lumière incidente.

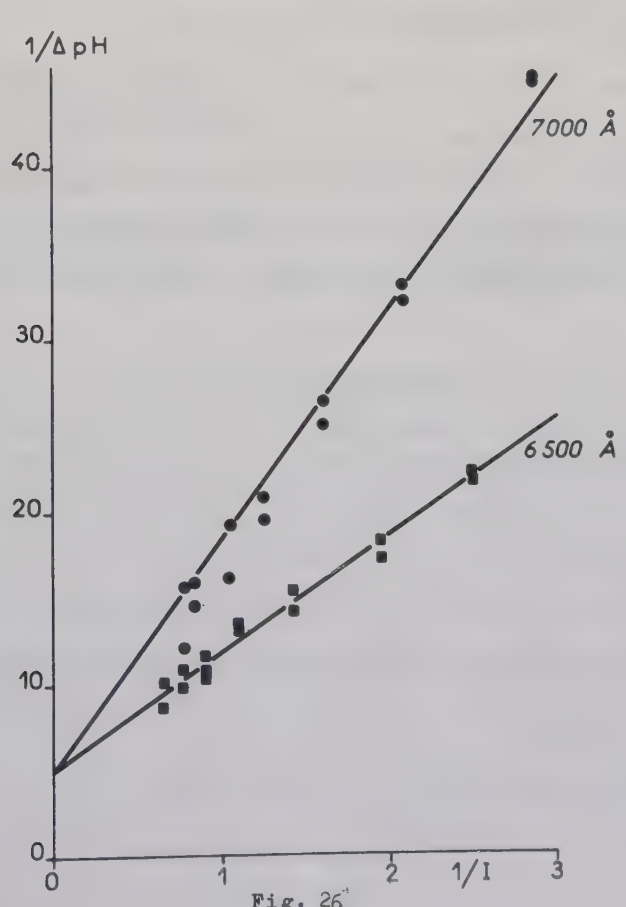


Fig. 26

La figure 26 représente les rapport $1/\Delta pH$ en fonction de $1/I$, mesurés aux deux longueurs d'ondes indiquées. I est la densité de flux énergétique de la lumière monochromatique.

Protocole expérimental :

3 ml de suspension de chloroplastes contenant : 50 µg de chlorophylle, 15.10^{-5} mM de pyocyanine, 3.10^{-2} mM de $MgCl_2$, sont agités et maintenus à 5°C. Le pH de la suspension non tamponnée est ajusté à 6 avec HCl 10^{-3} M ou NaOH 10^{-3}M. La suspension est éclairée avec des densités de flux énergétique variant de :

8 000 à 30 000 erg, cm^{-2}, s^{-1} pour 6 500 Å
7 000 à 25 000 erg, cm^{-2}, s^{-1} pour 7 000 Å

On utilise le monochromateur de BAUSH et LOMB, dont la lampe d'alimentation est reliée à un rhéostat. On détermine les densités de flux énergétique avec une thermopile.

Les deux droites représentées sur la figure 26 convergent vers un même point sur l'axe des ordonnées. A éclairement saturant, la quantité de protons fixés par les chloroplastes est la même pour les deux longueurs d'onde. Cette valeur est voisine d'un proton fixé par molécule de chlorophylle présente.

Le tableau VII représente les rapports $\frac{H^+}{ATP}$ obtenus en éclairant les chloroplastes à des longueurs d'ondes de 6 500 Å, 7 000 Å et 7 200 Å. Les valeurs indiquées représentent une moyenne de 6 déterminations pour chaque longueur d'onde. Pour chaque essai, la concentration finale en phosphate était de 5.10^{-5}M.

TABLEAU VII

a) λ = 6 500 Å $H^+/ATP = 98 \pm 14$	λ = 7 000 Å $H^+/ATP = 96 \pm 6$
b) λ = 6 500 Å $H^+/ATP = 89 \pm 15$	λ = 7 200 Å $H^+/ATP = 91 \pm 16$

On constate que le rapport $\frac{H^+}{ATP}$ est constant à ces longueurs d'ondes (les valeurs obtenues pour ces rapports sont très élevées mais ceci résulte des faibles concentrations en phosphate : 5.10^{-5}M dans la suspension finale).

Ainsi l'étude du rapport $\frac{H^+}{ATP}$ nous montre que dans les conditions expérimentales où l'on fait varier un des paramètres commun aux deux réactions, pH du milieu I ou longueur d'onde excitatrice, ce rapport est constant.

c) Rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction de la concentration en ions orthophosphate

En étudiant l'influence de la concentration en ions orthophosphate, nous agissons non plus sur un phénomène induit par la lumière, mais seulement sur la révélation de ce phénomène et plus précisément sur la révélation de X_e. Celle-ci se fait à l'obscurité au moyen de la synthèse d'ATP.

Nous avons observé dans le chapitre IV, paragraphe C), 2°, l'influence de la concentration des ions phosphate sur la synthèse de l'ATP, lors des phosphorylations en deux étapes. Lorsqu'on augmente la quantité de phosphate dans le milieu II (type J) la quantité d'ATP synthétisé augmente.

On peut donc s'attendre à une diminution du rapport $\frac{H^+}{ATP}$ lorsqu'on augmente la concentration en ions phosphate du milieu, toutes conditions restant égales par ailleurs. C'est en effet ce que l'on trouve.

La courbe de la figure 27 représente le rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction de la concentration en phosphate. Cette courbe décroit pour tendre vers la valeur de 5, pour une concentration de 50 µM de phosphate, ml^{-1}, 250 µg de chlorophylle^{-1}. (Il faut remarquer que lorsque nous avons étudié dans a) et b) les rapports $\frac{H+}{ATP}$, nous n'avons pas obtenu cette valeur de 5, mais des valeurs plus élevées, car les concentrations en phosphate, généralement utilisées, sont : 5 µM de phosphate par ml et pour 0,5 mg de chlorophylle, c'est à dire

inférieures aux concentrations optimales pour la synthèse d'ATP, dans les expériences du type J.

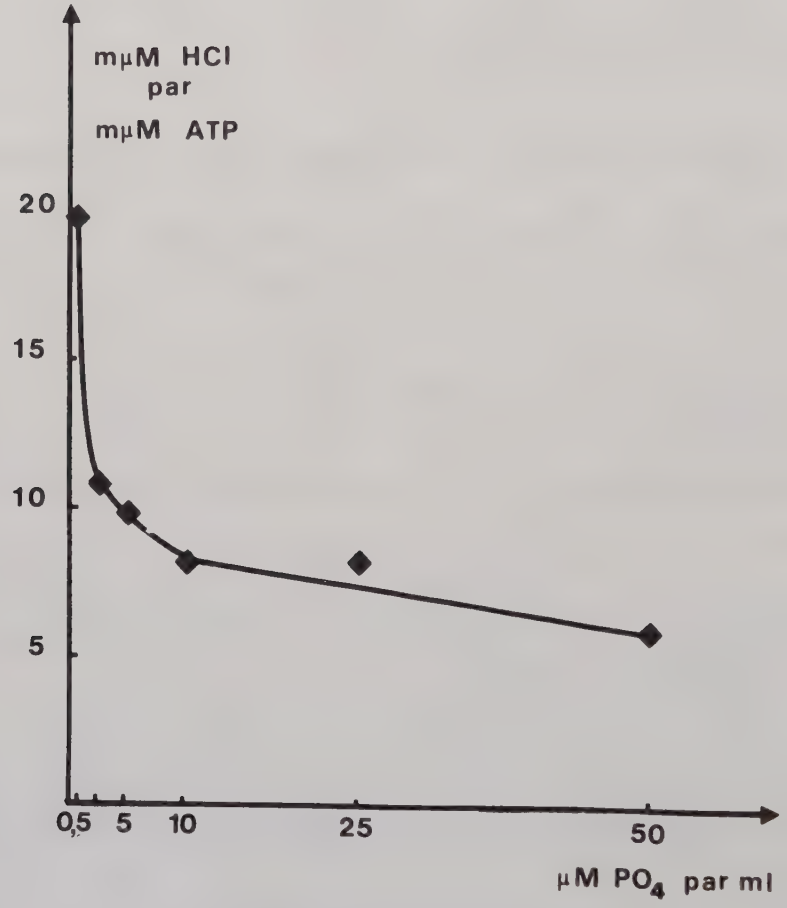


Fig. 27

La figure 27 représente le rapport $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction de la concentration du milieu en orthophosphate.

Le protocole expérimental et la composition des milieux sont les mêmes que ceux décrits avec la figure 25. Le milieu II diffère seulement par les quantités de phosphate qu'il contient, et qui varient de 1 à 100 μM de PO_4. Le pH pendant la phase lumineuse est maintenu à 6 au moyen du pH-stat.

La limite vers laquelle tend ce rapport est probablement supérieure à la réalité. Nous pensons en effet que les quantités d'ATP synthétisé ne peuvent pas révéler la totalité des X_e formés. En effet les temps de formation puis de destruction d'une entité prenant naissance dans une réaction photochimique (X_e) doivent être très inférieurs à ceux prenant naissance dans une réaction enzymatique, (synthèse d'ATP).

Nous pouvons donc penser que la valeur limite 5 du rapport H^+/ATP obtenue pour une concentration infinie en orthophosphate n'est qu'une limite supérieure.

D'autre part la constance des rapports $\frac{H^+}{ATP}$ en fonction du pH initial et de la longueur d'onde de la lumière incidente nous font plaider en faveur d'un schéma en série, pour ces deux réactions. Nous pensons que dans le schéma en série c'est X_e qui est formé en premier, et que le ou les protons viennent se fixer sur lui, pour former une entité relativement stable. Nous savons en effet qu'à pH 8, X_e se forme, mais sa durée de vie est très courte. X_e protoné pourrait donc être une forme de stockage du pouvoir phosphorylant dans le chloroplaste, induit par la lumière.

D) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Dans une étude faite en 1966, CLAYTON [60] montre que le passage des chloroplastes d'un milieu acide dans un milieu alcalin, provoque une luminescence, dont le spectre est celui de la fluorescence de la chlorophylle. Ainsi dans les mêmes conditions que celles indiquées par JAGENDORF [27] pour les phosphorylations induites par la transition acide-base et à l'obscurité (X'_e), CLAYTON observe une émission de lumière. Il y a donc accumulation d'énergie dans les chloroplastes, pendant le passage acide-base qui peut se manifester sous deux formes, l'une étant la synthèse d'ATP, l'autre l'émission de lumière. CLAYTON indique qu'en milieu phosphorylant la luminescence a toujours lieu.

Ces résultats ont amené FALLOT P. et LAINE M. [61] à étudier l'émission de lumière consécutive à une élévation de la température des chloroplastes. Ils montrent que des chloroplastes laissés à l'obscurité et amenés de 0°C à des températures variant entre 10° et 50°C, émettent une lumière correspondant au spectre de fluorescence de la chlorophylle, et proportionnelle à la température à laquelle les chloroplastes sont portés.

Fixation de protons et photophosphorylation du type Iagendorf en fonction de la température de chauffage des chloroplastes

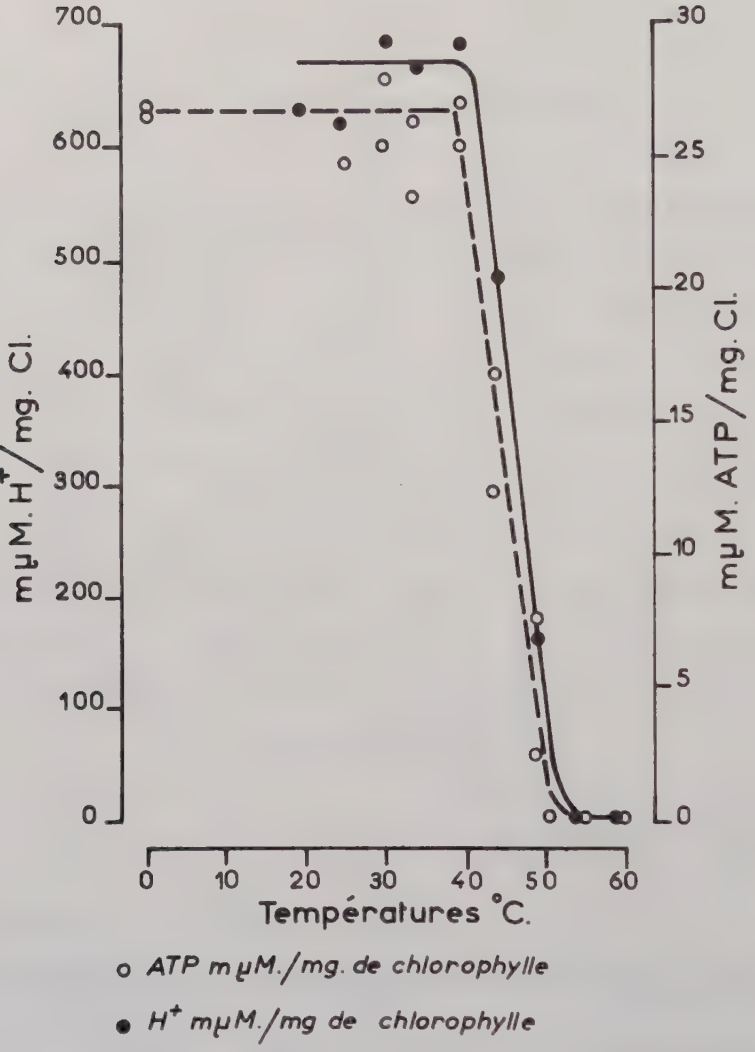


Fig. 28

Protocole expérimental :

0,5 ml de suspension de chloroplastes contenant 2 mg de chlorophylle est ajouté à 2 ml d'eau portée aux différentes températures. On laisse le mélange à la température choisie pendant 1 minute et on le refroidit pendant la minute suivante dans la glace. 2 ml de cette suspension refroidie sont ajoutés à 1 ml d'eau contenant de la pyocyanine et du chlorure de magnésium, respectivement 15.10^{-5}M et 3.10^{-2}M. Le pH de la suspension est amené à 6 soit avec HCl 10^{-2}M soit avec NaOH 10^{-2}M. Puis on éclaire en lumière blanche. Lorsque le pH de la suspension a atteint une valeur stable, on prélève dans une seringue obscurcie et contenant le milieu de phosphorylation (milieu II) 1 ml de la suspension de chloroplastes et 30 secondes plus tard on arrête la réaction avec 0,2 ml de HCl 1 M.

La quantité de protons fixés est déterminée en mesurant le pouvoir tampon des chloroplastes par addition de quantité connue de NaOH à la suspension. La variation de pH observée, permet alors, de calculer la quantité de protons fixés à la suite de l'éclairement.

Ainsi ces chloroplastes ont perdu sous forme de luminescence et à la suite d'une variation de température, une énergie potentielle préexistante. Ces résultats nous ont conduits à poser la question suivante : les chloroplastes ayant perdu une certaine quantité d'énergie (sous forme de luminescence) sont-ils capables de récupérer de l'énergie par un éclairement pour être encore le siège de réaction de photophosphorylations ou de fixations de protons.

Nous avons donc étudié l'influence du chauffage des chloroplastes sur la capacité à fixer les protons et celui de former X pendant un éclairement.

La figure 28 montre l'influence d'un préchauffage des chloroplastes sur la fixation des protons d'une part, et la formation d'ATP (X_e) d'autre part.

La fixation des protons et l'apparition de X_e réagissent semblablement à un préchauffage. Les deux courbes de la figure 28 sont parallèles et au-delà de 40°C les chloroplastes sont inhibés de la même façon par rapport aux deux réactions induites par la lumière.

CONCLUSION

Les résultats que nous obtenons en mesurant la fixation des protons et l'apparition du ΔpH sur la même suspension de chloroplastes éclairés confirment l'existence d'une liaison étroite entre les deux phénomènes.

En effet nous constatons un parallélisme entre la cinétique d'apparition (ou de disparition) de X_e et celle de la fixation (ou de la libération) des protons (fig. 23 et 24).

Ce parallélisme existe aussi lorsque l'on compare l'influence du pH initial de la suspension de chloroplastes (fig.25) et celle de la température de préchauffage des chloroplastes (fig. 28).

L'étude du rapport H^+/ATP en fonction du pH initial de la suspension de chloroplastes (tableau VI) et de la longueur d'onde de la lumière incidente (tableau VII) montre qu'il y a une relation stoechiométrique entre ces deux phénomènes.

Le résultat relatif à l'étude du rapport H^+/ATP en fonction de la concentration du milieu II en ions orthophosphate (fig. 27) confirme l'existence d'une relation stoechiométrique entre ces deux phénomènes. Mais dans ce cas précis, en faisant varier la concentration en ions orthophosphate, nous avons fait varier un paramètre, n'influençant que la révélation de X_e (par la synthèse d'ATP à l'obscurité à pH 8). La formation de X_e et la fixation de protons qui se déroulent dans le milieu I sont naturellement indépendantes de la concentration du milieu II en ions orthophosphate.

La valeur limite de ce rapport extrapolée à une concentration infinie en ions orthophosphate est égale à 5. Nous pensons que cette valeur est supérieure à la réalité, car la synthèse d'ATP qui est une réaction enzymatique est nécessairement une réaction plus lente que la réaction photochimique de formation de X_e et de plus X_e n'a qu'une durée de vie faible (inférieure à 30 secondes). Nous pensons donc que la totalité de X_e n'est pas révélée.

Le parallélisme et la relation stoechiométrique que nous obtenons en étudiant la formation de X_e et la fixation des protons , nous fait opter pour un déroulement en série des deux phénomènes

$$\text{chlorophylle} + h\nu \longrightarrow \text{chlorophylle}^* \longrightarrow X_e \longrightarrow \triangle pH$$

Nous pensons que dans ce schéma, la formation de X_e précède celle de la fixation des protons. Il est en effet nécessaire que les protons soient libérés dans le milieu par une élévation du pH, pour que X_e puisse après activation de l'orthophosphate synthétiser l'ATP. Nous savons d'autre part qu'à pH 8 on obtient une synthèse d'ATP dans les phosphorylations continues, qui se déroulent à la lumière. Il y a donc formation de X_e à ce pH, mais il est immédiatement en contact avec l'orthophosphate et l'ADP pour synthétiser l'ATP. A pH 8, seulement très peu de protons sont fixés (voir fig. 25).

Nous émettons donc l'hypothèse, qu'à bas pH les protons viennent bloquer le passage des électrons au niveau de la formation de X_e , en se fixant sur le (ou les) site même responsable de X_e ou un site voisin. La dissociation de ce (ou ces) site pendant la phase obscure, accélérée par l'élévation du pH du milieu , permettrait aux électrons de continuer leur "chemin".

X_e serait donc une molécule , ou un ensemble de molécules, qui sous forme protonée serait relativement stable, et conserverait pendant une durée mesurable l'énergie nécessaire à l'activation de l'ion phosphate. Mais X_e ne pourra être révélé, qu'après dissociation des sites protonés, et seulement alors l'ion orthophosphate sera activé.

Nous schématisons cette hypothèse comme suit :

$$\text{chloroplaste} + R \xrightarrow{h\nu} R^-$$

$$\begin{cases} R^- + H_2O \longrightarrow RH + OH^- \\ \text{ou à pH acide} \\ R^- + H^+ \longrightarrow RH \end{cases}$$

à l'obscurité

$$RH \longrightarrow R^- + H^+$$

ou à pH 8

$$RH + OH^- \longrightarrow R^- + H_2O$$

$$R^- + P_i \longrightarrow R + \sim P_i + e^-$$

R est le composé réduit par la lumière, au niveau duquel se forme X_e .

CONCLUSION

Tout au début de cet exposé, nous avons rappelé que le mouvement des électrons initialement provoqué par l'absorption des photons par les molécules de pigments du chloroplaste, et rendu possible grâce à la présence de médiateur électrochimique, avait pour conséquence la création à l'intérieur du granum d'un "état activé" obtenu par une modification de la structure des lamelles chloroplastiques ou de l'état redox de certaines molécules les composant. Cet "état activé" permet au granum d'acquérir la capacité de former à l'obscurité et à pH 8 de l'ATP.

Dans la première partie de ce travail nous avons exposé les expériences qui nous ont permis de conclure à l'existence de cette capacité sous trois formes distinctes : X_e, X'_e et $X \sim P$, correspondant chacune à un état activé particulier du granum.

La deuxième partie de cette thèse est consacrée à la mise en évidence du parallélisme existant entre l'importance de X_e formé et le nombre de protons fixés ; l'évolution de ces deux grandeurs étant étudiée soit pendant la phase lumineuse, soit pendant la phase obscure, au sein d'une même suspension de chloroplastes. La relation stoechiométrique reliant ces deux phénomènes est dégagée

I - DIFFERENTES FORMES DE L'ETAT ACTIVE DU GRANUM

Nos résultats exposés au chapitre IV, nous amènent à la conclusion qu'il existe trois composés (ou états) activés du granum : X_e, X'_e et $X \sim P$ dont la présence rend possible la synthèse d'ATP à l'obscurité par lasuspension de grana. X_e et X'_e ne sont pas phosphorylés alors que $X \sim P$ l'est.

Il est possible que la formation de $X \sim P$ soit précédée par celle de X_e, mais nos résultats relatifs à l'action de certains agents, sur la formation de X_e , X'_e et $X \sim P$ montrent que $X \sim P$, X_e et X'_e se comportent très différemment.

1) Différences de comportement entre X_e et X'_e

Nos argument en faveur d'une distinction entre les sites de formation de X_e et de X'_e sont les suivants :

a) L'action prolongée d'un tampon acide (pH 4,6) sur une suspension de grana inhibe la formation de X_e, mais favorise celle de X'_e

Considérons la courbe 1 de la figure 11 (pg 50). Celle-ci montre une inhibition de la formation de X_e (révélé par l'ATP synthétisé) après un temps supérieur à 2 minutes d'incubation dans le tampon acide de pH 4,6. La courbe 2 de la figure 11 montre aussi une diminution importante de la quantité de X_e formé, après une incubation de 2 minutes à l'obscurité dans le même tampon acide. Au contraire, la courbe 3 de la figure 11 montre que l'incubation prolongée de la suspension de grana dans le tampon acide provoque une augmentation de la quantité de X'_e formé. Cette quantité augmente pendant les deux premières minutes puis demeure constante lorsque l'incubation se prolonge de 2 à 10 minutes.

Les courbes 1, 2 et 3 de la figure 11 tendent vers une même valeur après 10 minutes de séjour à pH 4,6 , valeur qui ne représente plus que l'ATP synthétisé à partir de X'_e.

Les courbes 1 et 2 de la figure 12 (pg.52) expriment le même résultat que les courbes 1, 2 et 3 de la figure 11 , à savoir que l'action prolongée d'un tampon acide inhibe la formation de X_e, mais favorise celle de X'_e . Nous constatons qu'après 10 minutes d'action du tampon acide (c'est à dire des protons) sur la suspension de grana les sites où pouvait se former X_e sont détruits, seuls restent ceux où se forme X'_e.

b) L'action prolongée d'un tampon acide (pH 4,6) sur une suspension de chloroplastes entiers, n'inhibe pas la formation de X_e, mais favorise celle de X'_e

La figure 13 montre que les chloroplastes entiers ne réagissent pas à l'action du tampon acide (c'est à dire des protons) même après 10 minutes de contact. Les sites où se forme X_e n'ont pas été accessibles aux protons chez les chloroplastes entiers. Par contre, les courbes 2 de la figure 12 et 2 de la figure 13 sont analogues ; la quantité de X'_e augmente entre 0 et 2 minutes puis demeure constante entre 2 et 10 minutes de séjour dans le milieu acide, qu'il s'agisse d'une suspension de grana (Fig. 12)ou de chloroplastes entiers (Fig. 13). Les protons ont eu accès aux sites où se forme X'_e dans les deux préparations.

c) Dans des suspensions de chloroplastes entiers ou cassés (grana) les ions orthophosphate présents en forte concentration dans le milieu I acide inhibent la formation de X_e mais ne modifient pas celle de X'_e.

Nous comparons les courbes du type B des figures 16 et 17 (pg. 65 et 66) avec la courbe du type B de la figure 18 (pg. 68). Elles représentent la synthèse d'ATP par des chloroplastes entiers ou par des grana en fonction de la concentration en ions orthophosphate, lorsque ceux-ci sont présents pendant la phase lumineuse dans le milieu acide dans le cas des figures 16 et 17, et lorsque ceux-ci sont présents à l'obscurité dans le milieu acide avant la variation de pH (Fig. 18). Nous voyons ainsi sur les figures 16 et 17 que les concentrations élevées en ions orthophosphate inhibent la formation de X_e ; la figure 18 nous montre au contraire que la

présence de fortes concentrations en ions orthophosphate dans le milieu acide n'inhibe pas la formation de X'_e.

Ainsi, au sein d'une suspension de chloroplastes, l'action prolongée des protons d'une part et l'action de fortes concentrations en ions orthophosphate d'autre part ont sur la formation de X_e des effets opposés à ceux qu'elles ont sur la formation de X'_e. Nous sommes donc amenés à conclure que X_e et X'_e correspondent à deux états activés différents du chloroplaste.

2) Formation à la lumière d'un composé phosphorylé ($X \sim P$) précurseur de la synthèse d'ATP

Nous appelons $X \sim P$ cette troisième forme de l'état activé du chloroplaste, dans laquelle intervient directement l'ion orthophosphate.

Nos résultats indiquant son existence, se divisent en deux catégories : ceux obtenus en présence de faibles, et ceux obtenus en présence de fortes concentrations en ions orthophosphate.

a) Les résultats obtenus en présence de faibles concentrations en ions orthophosphate sont résumés dans le tableau I (pg. 58)

La quantité d'$AT^{32}P$ synthétisé est plus importante lorsque les ions orthophosphate marqués et non marqués ($^{32}PO_4 + {}^{31}PO_4$) sont présents dans le milieu I acide pendant la phase lumineuse (ATP_B) que lorsqu'ils ne sont présents que dans le milieu II à pH 8 pendant la seule phase obscure (ATP_J).

Cette quantité (ATP_B) est aussi supérieure à la quantité d'$AT^{32}P$ obtenue lorsque les ions orthophosphate non marqués sont présents dans le milieu I et les ions orthophosphate radioactifs seulement dans le milieu II (ATP_C).

Si nous désignons par ATP_A l'$AT^{32}P$ synthétisé à la lumière dans le milieu I à partir du seul ADP préexistant dans le chloroplaste, la différence

$$ATP_B - (ATP_A + ATP_C)$$

correspond à une valeur positive pour l'$AT^{32}P$ synthétisé. Cette quantité d'$AT^{32}P$ synthétisé le serait à partir d'un composé phospho-

rylé à la lumière : $X \sim P$ autre que X_e et qui viendrait s'ajouter à ce dernier pour rendre possible à l'obscurité et à pH 8 la synthèse de l'ATP.

b) Trois résultats obtenus en présence de fortes concentrations en ions orthophosphate viennent confirmer la formation à la lumière d'un composé $X \sim P$.

α - La formation de pyrophosphate par une suspension de grana éclairés, dans le milieu I à pH 6. L'ion orthophosphate est donc activé à ce pH et forme du pyrophosphate en se fixant sur une molécule d'orthophosphate voisine.

β - La différence entre la demi-vie du composé activé à la lumière en présence d'ions orthophosphate et celle de celui activé par la lumière en absence d'ions orthophosphate :

$$t\ 1/2\ (X \sim P) > t\ 1/2\ (X_e),$$ (Fig. 20, pg 81).

Ce résultat conduit à distinguer le composé activé en présence d'ions orthophosphate : $X \sim P$, de celui activé en leur absence : X_e.

σ - La différence de stabilité entre le composé activé à la lumière en présence d'ions orthophosphate ($X \sim P$) et celui activé en absence de ces ions (X_e) vis à vis d'une variation de la concentration en ions magnésium du milieu I acide : La demi-vie de $X \sim P$ reste constante quelque soit la concentration en ions magnésium, alors que celle de X_e diminue lorsque cette dernière augmente. C'est ce que représentent les figures 21 pg. 82 et 22 pg. 84 .

Remarquons que la mise en évidence de $X \sim P$ n'est faite que par des moyens indirects. Comme ce fut le cas pour X_e ou X'_e nous n'avons pas trouvé pour $X \sim P$ une technique permettant de l'isoler ou de montrer qu'il représente une conformation particulière du chloroplaste.

Nous pensons par ailleurs que la formation de $X \sim P$ dépend de la présence d'ions magnésium puisque :

a - l'inhibition de la synthèse d'ATP par les fortes concentrations en ions orthophosphate présents pendant l'éclairement est levée lorsqu'on augmente (10 fois) la concentration du milieu en ions magnésium, comme il apparait en comparant la courbe "ATP" de la figure 19 (pg.77) avec les courbes du type B des figures 16 et 17 (pg.65 et 66).

b - Lorsque la concentration en ions magnésium augmente, la quantité d'ATP synthétisé à partir d'une suspension de grana éclairée en présence d'ions orthophosphate, augmente ; mais cette même quantité d'ATP diminue si les ions orthophosphates sont présents seulement à l'obscurité, dans le milieu à pH 8 ; les tableaux II et III de la page 71 résument ce résultat.

c - Nous avons observé des quantités pondérables de pyrophosphate seulement en présence de concentrations élevées en ions magnésium (10^{-1}M) dans la suspension de grana éclairée.

Ainsi la formation de $X \sim P$ et celle de X_e réagissent différemment à la présence des ions magnésium.

Enfin, l'effet inhibiteur des ions magnésium à la fois sur la formation de X_e et sur la fixation des protons plaide en faveur d'une compétition entre les protons et les ions magnésium, les ions magnésium étant susceptibles d'aller eux aussi, lorsqu'ils sont présents en quantité suffisante, se fixer sur certains sites chargés négativement ayant pris naissance à la lumière.

L'ensemble des résultats exposés dans cette première partie de la conclusion montre que la synthèse de l'ATP est l'étape finale de stockage d'énergie, commune aux trois différents états activés du granum et obtenue à partir de chacun d'eux.

Notons que dans ce travail l'étude des états activés est faite par des moyens indirects. Nous n'avons isolé aucune forme de ces états ; nous apportons seulement la preuve que dans certaines conditions non seulement l'ADP mais aussi l'ion orthophosphate peut servir d'accepteurs au phosphate activé pour former du pyrophosphate. Mais l'étude concernant l'activation même de l'ion orthophosphate avant sa fixation sur l'ADP (ou l'orthophosphate) doit être pour-

suivie pour comprendre comment le granum permet à l'énergie apportée par la lumière ou par la variation de pH d'être utilisée pour l'activation d'une molécule d'orthophosphate présente dans le milieu. C'est cette molécule d'orthophosphate activée qui, en se fixant sur l'accepteur présent (ADP ou PO_4), matérialise le stockage de l'énergie accumulée dans le granum.

II. PARALLELISME ET RELATIONS STOECHIOMETRIQUES ENTRE LA FORMATION DE X_e ET LA FIXATION DE PROTONS

La deuxième partie de nos expériences, exposée au Chapitre V, confirme l'existence d'une liaison étroite entre la fixation des protons et l'apparition de X_e dans une suspension de grana éclairés.

Les mesures des deux phénomènes ont été effectuées simultanément sur la même suspension de grana, contrairement aux études faites précédemment et citées au début du Chapitre V.

Nous observons d'une part un parallélisme entre l'apparition de X_e et la fixation des protons en fonction de certains paramètres, et d'autre part, une relation stoéchiométrique entre les deux phénomènes.

1) Parallélisme entre X_e et $\triangle$pH

Nous l'observons en étudiant sur la même suspension de grana :

a) - à la lumière, les cinétiques de formation de X_e et de fixation des protons, puis,

- à l'obscurité celle de disparition de X_e et de libération des protons , Figures 23 et 24 pg. 112 et 113.

b) la formation de X_e et la fixation des protons, en fonction du pH initial de la suspension (Figure 25, pg.114).

c) l'influence de la température de préchauffage des grana (Fig. 28, pg. 122).

2) Relation stoéchiométrique

La relation stoéchiométrique apparait lorsque nous comparons la quantité de X_e formé (évaluée par l'ATP synthétisé) avec celle des protons fixés par la même suspension de grana dont on fait varier :

a - le pH initial (tableau VI pg.116)
b - la longueur d'onde de la lumière qui l'éclaire (tableau VII, pg. 118).

Dans ces deux séries d'expériences le rapport : protons fixés/ATP formé est constant.

c - lorsque nous faisons varier la concentration en ions orthophosphate du milieu II maintenu à pH 8, le rapport protons fixés/ATP décroit lorsque la concentration en ion orthophosphate augmente. Il tend vers une valeur limite de 5 pour une concentration de 50 µM PO_4/ml (Fig. 27, pg.120). Ici nous n'agissons pas sur les deux phénomènes induits par la lumière, mais sur la seule révélation de X_e, qui se déroule à l'obscurité. Rappelons que nous avions déjà observé au Chapitre IV, paragraphe 6, que la synthèse d'ATP augmentait lorsque la concentration en phosphate augmentait dans le milieu II. La diminution du rapport H^+/ATP en fonction de la quantité de phosphate présent dans le milieu II était donc prévisible pour une fixation de protons constante.

La valeur de 5 obtenue pour la limite de ce rapport est probablement supérieure à la réalité car la totalité de X_e apparaissant à la fin de l'éclairement n'est pas révélée à l'obscurité par la synthèse d'ATP, puisque X_e a une durée de vie limitée et les techniques de mélange des milieux I et II sont relativement lentes (de l'ordre de 0,5 seconde).

Les résultats relatifs au parallélisme et la relation stoechiométrique existant entre la formation de X_e et la fixation de protons montrent que ces deux phénomènes ne sont pas indépendants et nous font opter pour un déroulement en série des deux phénomènes, suivant le schéma :

chloroplastes $\xrightarrow{h\nu}$ $X_e \longrightarrow \Delta pH$

Nous pensons que la formation de X_e précède la fixation des protons pour les raisons suivantes :

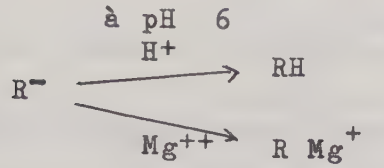
- pour que X_e puisse après activation de l'orthophosphate induire la synthèse de l'ATP, il faut que les protons soient libérés de leurs sites de fixation par une élévation de pH ;

- d'autre part nous savons qu'à pH 8 on obtient une synthèse d'ATP dans les phosphorylations continues, qui se déroulent entièrement à la lumière en présence d'orthophosphate et d'ADP. Il y a donc formation de X_e à pH 8, puisqu'il y a synthèse d'ATP, alors qu'à ce même pH nous n'avons qu'une très faible fixation de protons (voir figure 25, pg. 114).

Nous émettons donc l'hypothèse, qu'à bas pH les protons viennent bloquer le passage des électrons au niveau des molécules intervenant dans la formation de X_e, en se fixant sur le (ou les) site même responsable de X_e ou un site voisin. La dissociation de ce (ou ces) site protoné pendant la phase obscure, accélérée par une élévation du pH du milieu permettra aux électrons de poursuivre leur "chemin". X_e serait donc une molécule ou un ensemble de molécules qui, sous forme protonée, serait relativement stable et conserverait pendant une durée mesurable, l'énergie nécessaire à l'activation de l'ion phosphate. Maix X_e ne pourra être révélé qu'après dissociation des sites protonés, et seulement alors l'ion orthophosphate sera activé.

Ainsi, avec les techniques dont nous disposions, l'état activé du granum n'est observable que sous une forme stabilisée : la forme protonée. Mais nous avons vu précédemment que les ions magnésium entraient en compétition avec les protons, lorsque leur concentration était suffisante. Nous proposons donc un schéma suivant lequel le (ou les) site chargé négativement à la suite de l'éclairement pourrait (ent) fixer un des deux cations H^+ ou Mg^{++}. Chacun des nouveaux sites ayant fixé le cation représentant une forme stabilisée de l'état activé du granum. Si nous désignons par R^- l'ensemble des sites chargés négativement par suite de l'éclairement nous aurons le schéma suivant :

chloroplastes + $h\nu \longrightarrow R^-$



en présence de
fortes concentrations
en Mg^{++}

Le composé RH, à pH 8, libèrera le proton et redeviendra le composé primitif R^- capable d'activer directement l'ion phosphate ou source des électrons intervenant dans cette activation.

Par contre, on peut penser que l'ion orthophosphate s'associe déjà à la lumière au complexe $R\text{-}Mg^+$. Ce nouveau complexe phosphorylé $R - Mg\sim P$ plus stable que RH puisque sa demi-vie est supérieure à celle de RH, serait capable déjà à pH acide de donner naissance au pyrophosphate, ou à pH alcalin en présence d'ADP de former de l'ATP ; RH, aussi bien que $R\text{-}Mg\sim P$ (synonymes de X_e et $X\sim P$) ne sont décelables que grâce à leur stabilité relativement élevée.

La fixation des protons ne serait donc pas directement impliquée dans le mécanisme même de la synthèse d'ATP, ni même dans l'activation de l'ion orthophosphate, mais seulement dans la conservation du pouvoir d'activation de l'ion orthophosphate créé et accumulé pendant la période lumineuse pour X_e, et pendant la période obscure dans le milieu acide pour X'_e.

ABREVIATIONS

A, B, C, A_{ox} et B_{ox}	: transporteurs d'électrons sous forme oxydée
AH_2, BH_2,	: transporteurs d'électrons et d'hydrogène sous forme réduite
A red, B red	: transporteur d'électrons sous forme réduite
ADP et ATP	: adénosine di et triphosphate
Ad	: adénine
$(ATP)_A$, $(ATP)_B$, $(ATP)_C$, $(ATP)_J$	: ATP synthétisé dans les réactions du type A, B, C et J (voir p.)
CMU	: chlorophényl diméthyl urée
m-Cl-CCP	: carbocyanure m. chlorophényl hydrazone
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
FMN	: flavine mononucléotide
$NADP^+$, NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée et réduite
Pi	: orthophosphate
PMS	: phénazine méthosulfate
PQ	: plastoquinone
P_{700}	: pigment particulier présentant un pic d'absorption au voisinage de 7000 A°
PYO	: pyocyanine
Q	: quentcher (premier accepteur d'électron)
R^-	: composé contenu dans le granum, réduit sous l'action de la lumière.

Ru 5P, RuDP	: ribulose 5 phosphate et ribulose 1-5 diphosphate
Tris	: hydroxyméthyl amino méthane
µCi	: microcurie, unité de désintégration radioactive égale à $3,7.10^4$ désintégration/seconde.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ROBINSON G.W. Quantum processes in photosynthesis
Ann. Rev. of Physical Chemistry vol. 15 p. 311 (1964).

2 - DUYSENS, L.N.M. Studies on the mechanism of two photosynthetic pigment systems, by means of absorption and fluorescence difference spectrophotometry.
La photosynthèse, Colloque International du Centre Nat. de Rech. Scientifique N° 119, p. 75 (1963) Ed. C.N.R.S.

3 - RUMBERG, B. SCHMIDT-MENDE, P. WEIKARD, J. and WITT, H.T. Correlation between absorption changes and electron transport in photosynthesis.
Photosynthetic mechanisms of green plants p. 18
Nat. Acad. Sc.-Nat. Res. Council Ed. Publ. 1145 Washington D.C. (1963).

4 - CHANCE, B. and BONNER W.D. Jr.
The temperature insensitive oxidation of cytochrome f in green leaves. A primary biochemical event in photosynthesis.
Photosynthetic mechanism of green plants p. 66
Nat. Acad. Sc.-Nat. Res. Council Ed. Publ. 1145 Washington D.C. (1963).

5 - BISHOP, N.I.
" Quinones in electron transport"
Ciba Foundation Symposium, p. 385 (1961).

6 - HIND, G. NAKATANI, N.Y.
Determination of the concentration and the redox potential of chloroplasts cytochrome 559. BBA 216, 223-225 (1970).

7 - KOK, B. and HOH, G.
The photoreactions of photosynthesis
" La photosynthese" p. 93
CNRS. Ed. 1963

8 - ARNON, D.
Photosynthetic phosphorylation
"Biochemistry of chloroplasts" vol. II p. 476.
Goodwin Ed. 1967.

9 - CLARK, M.
Oxidation-reduction potential of organic systems. p. 496
William and Wilkin Ed. Baltimore.

10 - HILL, R. and BENDALL F.
Function of the two cytochrome components in chloroplasts : a Gorking hypothesis.
Nature 186 136 (1960).

11 - LIPMANN F.
Metabolic Generation and utilisation of phosphate bond energy.
Adv. in Enzymology vol. I p. 99. (1941).
Interscience Publishers, Inc. New-York.

12 - EMERSON R. and LEWIS C.M.
The dependence of the quantum yield of chlorella photosynthesis on wave length of light.
Am. J. of Botany, 30 n° 3, March, 1943, p. 165 p. 178

13 - BASSHAM, J.A. and CALVIN, M.
The path of carbon in photosynthesis
Prentice Hall, Englewood Cliffs N.I. (1956).

14 - ARNON, D.I., ALLEN, M.B. and WHATLEY, F.R.
Photosynthesis by isolated chloroplasts
Nature, 174, 394 (1954).

15 - ARNON, D.I. WHATLEY, F.R. and ALLEN, M.B.
Photosynthesis by isolated chloroplasts.
II. Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy.
J. Am. Chem. Joc. 76 6324, (1954).

16 - WHATLEY, F.R. ALLEN, M.B. ROSENBERG, L.L. CAPINDALE, J.B. ARNON, D.I.
Photosynthesis by isolated chloroplasts
Phosphorylation and carbon dioxide fixation by broken chloroplasts. W.A.R.C.A.
B.B.A. 20 462 (1956).

17 - HILL R.
The cytochrome components and chlorophyll in relation to the carbon cycle.
Proc. Intern. Congr. Biochem. 3rd Congress (Brussel) p. 225-227.
Academic Press N.Y. (1955).

18 - JAMES, V.O. and DAS, V.S.R.
The organisation of respiration in chlorophyll cells.
New Physiologist, 56 325 (1957).

19 - LUNDEGARD, H.
Response of chloroplasts cytochrome to light and substrates.
Nature, 192 243 (1961).

20 - HARBURG, O. KRIPPAHL, G. GEWITZ, H. and VOLKER, W.
Uber den chemischen mecanismus der photosynthese
Z. Naturforsch. 14b. 712 (1959).

21 - ARNON, D.I. TSUJIMOTO, H.Y. Mc JWAIN, B.D.
Photosynthetic phosphorylation and electron transport.
Nature, 207 1367 (1965).

22 - ARNÔN, D.I. WHATLEY, F.R. and ALLEN, M.B.
Assimilatory power in photosynthesis
Science, 127 1026 (1958).

23 - KROGMAN, D.W. JAGENDORF, A.T. ARNON, D.I.
Uncomplers of spinach chloroplasts photosynthetic phosphorylation
Plant Phys. 34 272 (1959).

24 - GOOD, N.E.
Re-assessment of the stoechiometry of photophosphorylation
Nature, 188, 661 (1960)

25 - STILLER, M. and VENNESLAND, B.
Photophosphorylation accompanying the Hill reaction with ferricyanide.
Biochem. Bioph. Acta 60 562 (1962).

26 - ARNON, D.I.
Conversion of light into chemical energy in photosynthesis.
Nature, 184 10 (1959).

27 - JAGENDORF, A.T. and AVRON, M.
Cofactors and rate of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts.
J. Biol. Chem. 231 277 (1958).

28 - AVRON, M.
Photophosphorylation by Swiss Chard chloroplasts.
Biochem. Bioph. Acta 40 257 (1960).

29 - COHN M.
A study of oxidative phosphorylation with ^{18}O-labelled inorganic phosphate.
J. Biol. Chem. 201 735 (1953).

30 - AVRON, M. SHARON, N.
A study of photophosphorylation with oxygen 18.
Biochem. Bioph. Res. Comm. 2 336 (1960).

31 - CLARK, V.M. and TODD, A.
In vitro phosphorylation involving oxidation of quinol phosphates.
dans " Quinones in electron transport" p. 190 Ciba Foundation.
J and A. CHURCHILL LTD LONDON 1961.

32 - VAMBUTAS, V.K. and RACKER, E.
Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation.
J. Biol. Chem. 240 2660 (1965)

33 - SHEN, G.M. and SHEN, Y.K.
The light intensity effect and intermediate steps of photophosphorylation.
Scientia Sinica II 1097 (1962)

34 - HIND, G. and JAGENDORF, A.T.
Separation of light and dark stages in photophosphorylation
Proc. Nat. Ac. of Sc. 49 715 (1963).

35 - JAGENDORF, A.T. and URIBE, E.
ATP formation, caused by acide-base transition of spinach chloroplasts.
Proc. Nat. Ac. of Sc. 55 170 (1966).

36 - URIBE, E.G. and JAGENDORF; A.T.
On the localisation of organic acids in acid induced ATP synthesis.
Plant physiology 42 697 (1967).

37 - URIBE, E.G. and JAGENDORF, A.T.
Organic acid specificity for acid induced ATP synthesis by isolated chloroplasts
Plant physiology, 42 706 (1967)

38 - MITCHELL, P.
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfert by a chemiosmotic type of mechanism.
Nature, 191 144 (1961).

39 - JAGENDORF, A.T. and HIND, G.
Studies on the mechanism of photophosphorylation.
"Photosynthetic Mechanism of green plants". p. 599.
Publication 1145, Nat. Ac. of Sc.-Nat. Res. Council Washington (DC) (1963).

40 - NEUMANN, J. and JAGENDORF, A.T.
Light induced pH changes related to photophosphorylation by chloroplasts.
Arch. Biochem. and Bioph. 107 109 (1964)

41 - CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R.
The respiratory chain and oxidative phosphorylation.
Adv. in Enzymology 17 65 (1956).

42 - LEHNINGER, A.L.
Oxidative phosphorylation
Harvey lecture, Série 49 (1953-54), 176 (1955).

43 - SLATER, E.C.
Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain.
Nature 172 975 (1953).

44 - SLATER, E.C.
"Oxidative phosphorylation"
Rev. Pure Appl. Chem. (Aust) 8 221 (1958).

45 - ROBERSON, R.N.
Ion transport and Respiration.
Biol. Rev. 35 231 (1960).

46 - TROWN, P.W.
Am improved method for isolation of carboxydismutase, probable identity fraction I protein, and the protein moiety of protochlorophyll.
Biochem. J. 4 908 (1965).

47 - VAN WAZER
Phosphorus and its compounds
Interscience publishers, New-York-London Vol I p. 889.

48 - TYSZKIEWICZ, E. GIRAULT, G. GALMICHE, J.M. and ROUX, E.
Contribution à l'étude des photophosphorylations.
Proc. of the 2nd Western Europe Conference on photosynthesis, p. 227.
Ad. Donker Publ. Rotherdam, The Netherland (1966).

49 - TYSZKIEWICZ, E.
Effect of magnesium ions on two stages phosphorylation and on the formation of an eventual high energy phosphorylated compound (X~P), precursor of ATP.
II. International photosynthetic Congress, Stresa (1971). (sous presse).

50 - SMITH, R.M. and ALBERTY, R.A.
The apparent stability constants of ionic complexes of various adenosine phosphate with divalent cations.
J. Am. Chem. Soc. 78 2376 (1956)

51 - CHARLOT, G.
Les méthodes de la chimie analytique.
Ed. Masson, p. 58

52 - RUMBERG, B. REINWALD, E. SCHRODER, H. and SIGGEL, U.
Correlation between electron flow, proton translocation, and phosphorylation in chloroplasts.
Naturwissenshaften 55 Jg., Haft p. 77 (1968).

53 - MAC CARTY, R.E.
Relation of photophosphorylation to hydrogen ion transport.
Biochem. and Bioph. Res. comm. 32 37 (1968).

54 - NISHIMURA, M. KADOTA, K. and CHANCE, B.
Light induced electron transfer, internal and external hydrogen ion changes and phosphorylation in chromatophore of Rhodospirilum Rubum.
Arch. of Biochem. and Bioph. 125 308 (1968).

55 - GALMICHE, J.M. GIRAULT, G. TYSZKIEWICZ, E. FIAT, R.
Photophosphorylation et translocation de protons
C.R. Ac. Sc. 265 374 (1967)

56 - MOTHES, J.
Prévisions et décisions statistiques dans l'entreprise.
Dunod ed. PARIS 1962 p. 212 - 221.

57 - TAGAWA, K. TSUJIMOTO, H.Y. and ARNON, D.I.
Rôle of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis.
Proc. Nat. Ac. Sc. 49 567 (1963).

58 - DILLEY, R.A. VERNON, R.P.
Quantum requierement of the light induced proton uptake by spinach chloroplasts.
Proc. Nat. Ac. Sc. 57 395 (1967).

59 - DILLEY, R.A.
Ion and water transport processes.
Energy concersion by the photosynthetic apparatus
Brookhaven Symposium in Biology n° 19 p. 258 (1966).

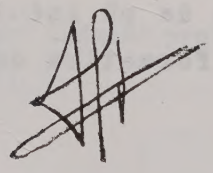
60 - BERGER, C.M. and CLAYTON, R.K.
Luminescence of chlorophyll in spinach chloroplasts induced by acid - base transition.
Proc. Nat. Ac. Sc. 55 494 (1966).

61 - LAINE-BÖSZÖRMENY, M. PAILLOTIN, G. FALLOT, P. ROUX, E.
Post-luminescence des chloroplastes intacts et altérés par dénaturation partielle ; étude expérimentale, interprétation théorique et calcul d'énergie d'activation.
Photochemistry and Photobiology 15 139 (1971)

TABLE DES MATIERES.

	Page
I. Introduction	1
II. Historique	8
III. Techniques et Méthodes	26
IV. Exposé des résultats obtenus relativement à X_e, X_e' et X∿P.	
Introduction	44
Résultats	48
Conclusion	87
Annexe I : Calcul de la quantité d'ions phosphate libre, en fonction de la concentration en ions magnésium du milieu	91
Calcul de la quantité d'ions magnésium libres, en fonction de la concentration en orthophosphate du milieu	101
V. Exposé des résultats relatifs au parallélisme entre la variation de pH induite par un éclairement et la formation de X_e.	
Introduction	110
Résultats	112
Conclusion	123
VI. Conclusion Générale	126
Abréviations	136
Bibliographie	138

Vu et approuvé

PARIS, le 5 juillet 1972

Le Président de l'Université de PARIS VI